

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ANEMIA HEMOLÍTICA EM BOVINOS DE CORTE EM
SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVO EM MATO GROSSO E
RONDÔNIA**

LEILANE APARECIDA DA SILVA RONDELLI

Cuiabá – MT

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ANEMIA HEMOLÍTICA EM BOVINOS DE CORTE EM SISTEMA DE CRIAÇÃO
EXTENSIVO EM MATO GROSSO E RONDONIA**

Autor (a): Leilane Aparecida da Silva Rondelli

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Aline Bobbi Antoniassi

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline Argenta Pescador

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade de animais domésticos e silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Cuiabá – MT

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A639a Aparecida da Silva Rondelli, Leilane.
Anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensivo em Mato Grosso e Rondônia / Leilane Aparecida da Silva Rondelli. -- 2017
63 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Nádia Aline Bobbi Antoniassi.
Co-orientadora: Caroline Argenta Pescador.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

1. hemoglobinúria. 2. doença hemolítica. 3. intoxicação.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ANEMIA HEMOLÍTICA EM BOVINOS DE CORTE EM SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVA EM MATO GROSSO E RONDÔNIA"

AUTOR : Mestranda Leilane Aparecida da Silva Rondelli

Dissertação defendida e aprovada em 24/02/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutora Nádia Aline Bobbi Antoniassi *NA*
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutor Carlos Eduardo Pereira dos Santos *CS*
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutor Fabiana Marques Boabaid *Fabiana M Boabaid*
Instituição : Universidade de Cuiabá - UNIC

Examinador Suplente Doutora Fernando Henrique Furlan Gouvêa
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 24/02/2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma oportunidade de crescimento e amadurecimento e pelas inúmeras bênçãos concedidas em minha vida.

Agradeço a minha família pelo companheirismo, amizade e apoio dispensados todos estes anos distantes, mas que serviram para deixar mais forte os laços de amor e carinho.

Agradeço a todos os professores, amigos e colegas de profissão que contribuíram direta e indiretamente para meu crescimento na vida acadêmica.

Agradeço a meu esposo André por todos os momentos de paciência e companheirismo dedicados a mim.

Muito obrigada!

RESUMO

ANEMIA HEMOLÍTICA EM BOVINOS DE CORTE EM SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVA EM MATO GROSSO E RONDÔNIA

Casos de anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensivo em Mato Grosso e Rondônia são acompanhados desde 2008. Os animais acometidos apresentavam fraqueza, mucosas pálidas ou ictericas, urina enegrecida, depressão e anorexia. Esse quadro muitas vezes evoluia para morte, principalmente quando os animais eram movimentados. Durante esse período aproximadamente 429 bovinos morreram em nove surtos. A morbidade apresentou valores de até 67,11% e a mortalidade chegou a 50%. Foi realizada investigação para as principais causas infecciosas, bem como para os possíveis agentes tóxicos relatados como causadores de anemia hemolítica em bovinos. Não se observou nas propriedades acompanhadas nenhuma doença infecciosa ou planta já descrita no Brasil como causadora de anemia hemolítica em animais de interesse pecuário no momento das investigações dos surtos. Apesar da etiologia desses casos ainda não ser conhecida, as evidências epidemiológicas, clínicas e patológicas da doença sugerem que a mesma seja causada por uma planta tóxica ainda não conhecida de ação hemolítica, presente nas propriedades acometidas, mas que ainda não foi confirmada experimentalmente.

Palavras-chaves: hemoglobinúria, doença hemolítica, intoxicação.

ABSTRACT

HEMOLYTIC ANEMIA IN BEEF CATTLE IN SYSTEM EXTENSIVE FARM IN MATO GROSSO AND RONDÔNIA.

Cases of hemolytic anemia in beef cattle in a extensive breeding system in Mato Grosso and Rondônia have been monitored since 2008. The affected animals presented weakness, pale or icteric mucosas, blackened urine, prostration and anorexia. The outcome of these cases often is death, principally if the animals are forced to walk. Approximately 429 cattle died in these outbreaks and in some of these, mortality rates ranged from 0.26 to 50%. Infectious causes and some toxic causes of hemolytic anemia in bovines were investigated. After histopathological examinations, special coloring, hematology, biochemistry and molecular tests, were excluded the possible causes. Any plant ready described in Brazil as cause of hemolytic anemia in animals from livestock interest was observed in those farms. Although the etiology of these cases is not yet known, clinical and pathological evidences of the disease suggested that it is caused by a toxic plant of hemolytic action, present in the affected properties, but not yet confirmed experimentally.

Keywords: hemoglobinuria, hemolytic plant, poisoning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: A. Mapa do Estado de Mato Grosso, em destaque (círculo verde) estão os municípios de Juína, Porto dos Gaúchos, Nova Uiratã, Matupá, Feliz Natal, e Terra Nova do Norte. B. Mapa do Estado Rondônia. Em destaque (círculo verde) está o município de Nova Mamoré. Fonte: Mapa-base: IBGE.....25
- Figura 2. *Pleonotoma mieloides* em beira de mata na propriedade do Surto 4 em Porto dos Gaúchos - MT. Pertence a família das Bignoniaceae é uma planta arbustiva com ramos glabros a esparsos-lepidoto, tetragonal, folhasa tri-ternadas, ocasionalmente ternado-bipinadas (Gomes, 2006).....25
- Figura3. Alterações macroscópicas observadas em bovinos com anemia hemolítica tóxica. A. Fígado de coloração amarelada com evidênciação do padrão lobular. B. Rim aumentado de volume e de coloração escura. C. bexiga contendo urina enegrecida.....29
- Figura 4. Fígado com necrose centrolobular, hepatócitos tumefeitos e infiltrado linfoplasmocitário, H&E, obj. 20x.....30
- Figura 5. A. Rim com material eosinofílico hialino no interior de túbulos. B. Rim com degeneração e necrose de túbulos uriníferos, evidenciada por núcleo picnótico e citoplasma tumefeito e vacuolizado, H&E, obj. 20x.....31
- Figura 6. Baço com grande quantidade de substância castanho claro caracterizada por hemossiderina dispersa pelo parênquima, H&E, obj.20x.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos surtos de bovinos diagnosticados com anemia hemolítica no período de 2008 a 2016.....	27
Tabela 2. Resultados de hemograma, enzimas hepáticas, exames bioquímicos e urinálise de bovinos diagnosticados com anemia hemolítica pelo LPV/LAPAN da UFMT de 2008 a 2016.....	33

ANEXOS

Anexo 1: Ficha utilizada em inquérito epidemiológico na investigação dos surtos de anemia hemolítica aplicado a proprietários durante visita a propriedades.....	38
Anexo 2: Comprovante de submissão do artigo na revista <i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>	39
Anexo 3: Artigo submetido a revista <i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>	40
Anexo 4: Certificado de aprovação no Comitê de Ética no uso animal.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Anemia.....	11
2.2 Causas tóxicas de anemia hemolítica	12
2.2.1 Intoxicação por Cobre.....	12
2.2.2 Plantas tóxicas hemolíticas no Brasil.....	12
2.2.2.1 <i>Brachiaria radicans</i>	12
2.2.2.2 <i>Ditaxis desertorum</i>	13
2.2.2.3 <i>Indigofera suffruticosa</i>	13
2.2.2.4 <i>Allium spp</i>	14
2.2.3 Plantas tóxicas hemolíticas em outros países.....	15
2.2.3.1 <i>Brassica spp</i>	15
2.2.3.2 <i>Acer rubrum</i>	16
2.3 Causas infecciosas de anemia hemolítica.....	16
2.3.1 Babesiose.....	16
2.3.2 Anaplasmosose.....	18
2.3.3 Leptospirose.....	18
2.3.4 Tripanossomíase.....	20
2.3.5 Hemoglobinúria bacilar.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Epidemiologia e sinais clínicos.....	24
4.2 Avaliação anatomopatológica.....	28
4.3 Exames complementares.....	31
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	37
ANEXOS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Anemia hemolítica é a destruição prematura de hemácias sem o aumento da taxa de reposição (FRY & MCGAVIN 2013) e é classificada em função do mecanismo de hemólise, localização (intravascular/extravascular), fisiopatologia (imunes/não imunes) e dependendo da velocidade de instauração (agudas/crônicas) (Piqueras et al. 2016). Anemia hemolítica se caracteriza clinicamente por dispnéia, intolerância ao exercício, palidez das mucosas, aumento da frequência cardíaca, hemoglobinemia, icterícia, hemoglobinúria, febre e depressão (LOPES et al., 2007). Dentre as causas de anemia hemolítica em bovinos destacam-se as doenças infecciosas, como leptospirose, babesiose, tripanossomíase, anaplasmoses e hemoglobinúria bacilar (RIET-CORREA et al., 2001; SCHILD et al., 2008; CADIOLI et al., 2012; SILVA et al., 2013; NUGEM, 2015; SILVA, 2015), as tóxicas como a intoxicação por cobre (NETO et al., 2014) e por plantas tóxicas. *Brachiaria radicans*, tanner-grass, é uma forrageira utilizada para ruminantes, presente em quase todo o território nacional e que tem sido relatada como causadora de quadros de anemia hemolítica nos estados de São Paulo e Santa Catarina (ANDRADE et al., 1971; ROSENFELD et al., 1971; GAVA et al., 2010). Ainda em Santa Catarina, foi relatado um surto de intoxicação por *Allium cepa* em búfalos com quadro de anemia hemolítica (BORELLI et al., 2009). No Brasil, há relatos ainda de intoxicação por *Ditaxis desertorum*, com importância limitada ao Estado da Bahia (TOKARNIA et al., 1997; TOKARNIA et al., 2012) e *Indigofera suffruticosa*, popularmente conhecida como “anil”, que causa intoxicações em bovinos na região nordeste do país (FIGUEIREDO et al., 2012). Fora do Brasil foram relatadas intoxicações de bovinos por *Brassica napus* nos Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha e Irlanda; de bovinos e ovinos por *Brassica oleracea* var. *acephala* nos Estados Unidos e Grã-Bretanha e de bovinos por *Allium canadense* e *Allium schoenoprasum* nos Estados Unidos (BURROWS&TYRL, 2013). Casos de intoxicação por *Acer rubrum* (“red maple”) foram descritos nos Estados Unidos em alpacas (DEWITT et al., 2004), equinos (ALWARD et al., 2006) e zebras (WEBER & MILLER, 1997). Uma enfermidade de caráter hemolítico tem sido frequentemente observada em bovinos de criação extensiva, desde o ano de 2008 nos estados de Mato Grosso e

Rondônia. Nenhuma das causas conhecidas de doença hemolíticas foram identificadas e evidências indicam como causa uma planta tóxica ainda não identificada. Diante disso, o objetivo deste estudo é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos da doença hemolítica que acomete bovinos em surtos acompanhados pela equipe do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) e Laboratório de Patologia Animal (LAPAN) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá e Sinop, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anemia

A anemia é a diminuição da massa de glóbulos vermelhos circulantes, levando a diminuição na capacidade de transporte de oxigênio (VALLI et al., 2016; COTRAN & COLLINS, 1999). Entre as causas de anemia está a destruição prematura de eritrócitos (hemólise), podendo ser categorizada como leve, moderada ou acentuada de acordo com os valores de hematócrito encontrados. Os sinais clínicos são referentes à diminuição do pigmento de hemoglobina, diminuição da capacidade de transporte de oxigênio e diminuição da viscosidade sanguínea (VALLI et al., 2016, FRY& MCGAVIN, 2013). Anemia hemolítica é a destruição de hemácias sem aumento da taxa de reposição (FRY&MCGAVIN, 2013) e é classificada de acordo com o mecanismo de hemólise, localização (intravascular/extravascular), fisiopatologia (imunes/não imunes) e dependendo da velocidade de instauração (agudas/crônicas) (PIQUERAS et al., 2016).

Na hemólise intravascular, a destruição das hemácias ocorre no interior da circulação sanguínea ocorrendo a ativação do complemento e é caracterizada pela presença de eritrócitos fantasmas, hemoglobina livre no plasma, hemoglobinúria e hemossiderose nas células tubulares renais por acúmulo de hemoglobina filtrada reabsorvida (VALLI et al., 2016; PIQUERAS et al., 2016). Na hemólise extravascular a destruição é fora dos vasos, acontecendo principalmente no baço pelo mecanismo fagocítico mononuclear (PIQUERAS et al., 2016).

2.2 Causas tóxicas de anemia hemolítica

2.2.1 Intoxicação por cobre

Os ruminantes em geral e, os ovinos em particular são bastante sensíveis à intoxicação por cobre, devido à incapacidade de eliminação biliar do cobre, permanecendo armazenado no fígado após da absorção (DÍAZ et al. 2015). A intoxicação ocorre de forma aguda e de forma crônica, com predomínio da forma crônica, onde há a deposição do mineral principalmente em órgãos como fígado, principal órgão envolvido no metabolismo desse mineral e o sistema biliar como a principal rota de excreção (ANTONELLI et al. 2010; NETO et al. 2014). No Brasil a intoxicação por este mineral ocorre principalmente em ovinos, tendo como maior fator causal a ingestão de rações para bovinos, com predomínio desses casos na região Sul do país (ANTONELLI et al. 2010). Quando o cobre ingressa no citoplasma, este elemento representa um risco para a célula, podendo causar dano oxidativo e crise hemolítica que pode surgir meses após o início da deposição (DÍAZ et al. 2015). As lesões mais comuns encontradas em casos de intoxicação são a necrose hepática e crise hemolítica, com icterícia e hemoglobinúria, seguida de bloqueio dos túbulos renais, havendo aumento de volume do rins e morte súbita (SUTTLE, 2010).

2.2.2 Plantas tóxicas hemolíticas no Brasil

2.2.2.1 *Brachiaria radicans*

O gênero *Brachiaria* ou *Urochloa spp.* compreende cerca de 100 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, em habitats variados e com as principais espécies de importância econômica nas Américas, sendo originárias da África do leste (DO VALLE et al. 2009). *Brachiaria spp.* são as forrageiras com maior importância na pecuária brasileira, mas possuem um fator limitante para sua utilização que é a sua toxicidade (RIET-CORREA et al. 2011). A *Brachiaria radicans*, conhecida também como capim *Tanner grass* ou capim braquiária-do-brejo, ocorre

em locais encharcados e às margens de lagos e rios (SOARES FILHO, 1996). Por ter ótima palatabilidade é ingerida em grande quantidade pelos bovinos, há casos de intoxicação na Costa Rica (VILLALOBOS et al. 1981) e no Brasil, no estado de São Paulo e de Santa Catarina (ANDRADE et al., 1971; ROSENFELD et al., 1971; GAVA et al., 2010). A forma grave da intoxicação experimental e espontânea só foi observada em animais que ingeriram a planta oriunda de solos férteis (turfosos) e como 100% da dieta. Diferente do que ocorre nas demais doenças que levam a anemia hemolítica, a febre e icterícia não ocorrem com a intoxicação por *B. radicans*. O princípio tóxico não está definido, mas há hipótese de um mecanismo semelhante ao que ocorre na intoxicação por *Brassica* sp. (GAVA et al., 2010).

2.2.2.2 *Ditaxis desertorum*

Ditaxis desertorum da família *Euphorbiaceae*, está presente no estado da Bahia como planta invasora de áreas de cultivo e é facilmente consumida pelo gado. Casos de intoxicação ocorrem geralmente após o mês de maio na região oeste da Bahia, quando a planta permanece verde durante a seca e os primeiros casos de intoxicação são observados após 8 dias de pastejo (RIET-CORREA et al., 2011). A toxidez da planta foi confirmada experimentalmente em bovinos por Tokarnia et al., (1997), com a reprodução de dois quadros clínico-patológicos diferentes: um de hemogloninemia por ação hemolítica, e outro de cólica devido ao efeito cáustico, acontecendo de acordo com a dosagem fornecida. Os achados de necropsia se concentraram mais no aparelho digestivo, e são caracterizados por edema e avermelhamento de mucosas, não observando icterícia. As principais alterações histológicas ocorrem no fígado e rins e são muito semelhantes a outros casos de anemia hemolítica por outras causas já relatadas em bovinos, mas o princípio ativo ainda permanece desconhecido (TOKARNIA et al., 1997; RIET-CORREA et al., 2011).

2.2.2.3 *Indigofera suffruticosa*

Indigofera suffruticosa pertence a família Papilionoideae e é pouco exigente quanto a qualidade de solos (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1988; LORENZI, 2000).

Essa planta é encontrada em abundância em grandes áreas do semi-árido do nordeste do Brasil, é também responsável por quadros de anemia hemolítica em bovinos. Os casos ocorrem em poucos dias após a introdução dos bovinos na pastagem, principalmente em anos com alta pluviosidade, quando há proliferação e invasão desta planta em pastagens nativas (TOKARNIA et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2011).

Aparentemente apresenta boa palatabilidade, afetando animais de idades variadas, com taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (TOKARNIA et al., 2002). Sua toxicidade no Brasil foi confirmada por casos de intoxicação natural de bovinos na Paraíba (SALVADOR et al., 2010). Reprodução experimental foi realizada em bovinos no Ceará (BARBOSA NETO et al., 2001), em caprinos e ovinos (FIGUEIREDO et al., 2012), e também em cobaias (*Cavia porcellus*) na Paraíba (SALVADOR et al., 2011). Os sinais clínicos, macroscopia e microscopia são típicos de anemia hemolítica, mas notou-se que antes da crise hemolítica os bovinos apresentavam a urina de coloração verde azulada (BARBOSA NETO et al., 2001). O princípio tóxico ainda não é conhecido (RIET-CORREA et al., 2011).

2.2.2.4 *Allium* spp.

Com cerca de 700 espécies, o gênero *Allium* apresenta distribuição cosmopolita. *Allium schoenoprasum* tem distribuição circumboreal na América do Norte e *Allium canadense* é presente na parte oriental do continente (BURROWS E TYRL, 2013).

Problemas são relatados, frequentemente, quando são utilizados resíduos ou excedentes de produção na alimentação de bovinos e ovinos, ou quando são adicionados em alimentos de animais de estimação para conferir efeito palatabilizante (LAZARUS & RAJAMANI, 1968; HUTCHISON, 1977; RAE, 1999; VAN DER KOLK, 2000; BORELLI et al., 2009; BURROWS E TYRL, 2013). Os efeitos tóxicos são cumulativos e a intoxicação geralmente continua após a ingestão repetida de grandes quantidades (BURROWS E TYRL, 2013). Há variação na

sensibilidade para formação de corpúsculos de Heinz entre espécies, com cães, gatos, bovinos, bubalinos e suínos sendo mais sensíveis (FENWICK & HANLEY, 1985; YAMATO & MAEDE, 1992; OSTROWSKA et al., 2004). Ovinos são menos sensíveis e são acometidos, geralmente, quando se encontram pastando em lugares onde há cultivo comercial de cebola (ASLANI et al., 2005). Cavalos são pouco sensíveis como demonstrado em experimentos realizados por Pearson et al. (2005) e Valle et al. (2006).

No Brasil, relato de intoxicação em búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) foi descrito por Borelli et al. (2009) em Santa Catarina, no qual cinco búfalos morreram após a ingestão de grande quantidade de cebolas. Quatro vacas, um bezerro e um touro da mesma fazenda também foram afetados, mas não morreram. Os sinais clínicos, achados de necropsia e histologia foram semelhantes á casos de anemia hemolítica por outras plantas. Icterícia não foi observada (BORELLI et al., 2009). Os achados são associados à metemoglobinemia grave típicos de anemia hemolítica, além de abortos, odor de cebola na respiração e nas fezes (HARVEY & RACKEAR, 1985; VAN DER KOLK, 2000; FIGHERA et al., 2002; NOTOMI et al., 2004; ASLANI et al., 2005). Os princípios tóxicos envolvidos na intoxicação por cebola e alho são os dissulfetos n-propildissulfeto, S-metil e S-pro(en)nyl cisteína sulfóxidos (SMCO) derivado de aminoácidos (HARVEY & RACKEAR, 1985; BLOCK, 1992; SELIM et al., 1999; YAMATO et al., 1999).

2.2.3 Plantas hemolíticas em outros países.

2.2.3.1 *Brassica* spp.

As plantas do gênero *Brassica* são comumente conhecidas por mostarda (*Brassica alba*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), nabo (*Brassica rapa* subsp. *rapa*) e couve (*Brassica oleracea*), e tem distribuição mundial (WARWICK, 2010). A intoxicação se dá através da ingestão em alta proporção por períodos prolongados, havendo maior toxidez em plantas maduras. A toxina responsável por causar anemia hemolítica com corpúsculo de Heinz é o sulfóxido de S-metilcisteína (SMCO) (PETROVSKI, 2015). A anemia é mais grave em bovinos, com início cerca

de 3 semanas após o consumo, podendo o quadro se estabilizar ou ocorrer a recuperação com a retirada da planta. A principal manifestação é a coloração escura da urina, não havendo outros sinais clínicos na maioria dos casos. Os achados de necropsia e histologia são semelhantes aos causados por outras plantas de ação hemolítica (BURROWS & TYRL, 2013).

2.2.3.2 *Acer rubrum*

Obordo (ou “red-maple”) é encontrado em todo o leste dos Estados Unidos, Canadá até a Flórida e o Texas (BURROWS & TYRL, 2013). Em cavalos, alpacas, pôneis e zebras o consumo do bordo vermelho provoca metahemoglobinemia e formação de corpúsculos de Heinz (ALWARD et al., 2006; BURROWS & TYRL, 2013). Os ruminantes parecem não ser sensíveis a toxina (DEWITT et al., 2004). Embora não se conheça o princípio tóxico e seu mecanismo de ação, o efeito oxidativo de *Acer rubrum* causa maior formação de metahemoglobinemia, afetando até 50% da hemoglobina circulante (CORRIHER et al., 1999; BURROWS & TYRL, 2013). Os sinais clínicos, achados laboratoriais, assim como os macroscópicos e microscópicos são característicos de anemia hemolítica que semelhante ao que ocorre devido a outros inúmeros agentes, sendo importante sempre fazer o diagnóstico diferencial (PLUMLEE, 2003).

2.3 Causas infecciosas

2.3.1 Babesiose

Babesias são protozoários eritrocitários obrigatórios, e pertencem ao gênero *Babesia* (LEVINE, 1971). Babesiose é importante em animais de produção, em regiões tropicais e subtropicais mundialmente, somente erradicados na América do Norte (SAHINDURAN, 2012; FRY & MCGAVIN, 2013). A transmissão ocorre pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e tem como principal hospedeiro o bovino (BOCK et al., 2004; FRY & MCGAVIN, 2013). Podem ser transmitidas entre bovinos por via transplacentária e por transfusões de sangue (FRY & MCGAVIN,

2013). *B. bovis* é a mais patogênica dentre as espécies que infectam os bovinos (TAYLOR, 2010). A inoculação de *B. bovis* realizada somente pelas larvas do carrapato cerca de 2 a 3 dias após a fixação destas e *B. bigemina* é inoculada por ninfas e adultos do carrapato após 9 dias da fixação destes (RADOSTITIS et al., 2008; MAHONEY & MIRRE, 1974; CALLOW & HOYTE, 1961). A predileção por capilares viscerais de órgãos como rins e cérebro causa anóxia por obstrução do fluxo sanguíneo (WHIGHT et al., 1989) podendo causar sinais clínicos nervosos (TAYLOR, 2010).

No Brasil, surtos de Babesiose cerebral ocorrem com mais frequência em bovinos adultos e em áreas de instabilidade enzoótica como a região Sul, onde há prevalência de taurinos, com alguns autores por vezes sugerindo que o fator causal seja a falta de imunidade por ausência de contato prévio com o vetor (RODRIGUES, 2005; SCHILD et al., 2008; ANTONIASSI et al., 2009; LOUREIRO et al., 2010).

Casos semelhantes foram descritos na Paraíba por GALIZA et al. (2010) e em São Paulo por Santa Rosa et al., (2013). Estudos divergem quanto a resistência a babesiose entre *Bos indicus* e *Bos taurus* (JONSSON et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; PIPER et al., 2010) e Giglioti, (2013) sugere que outros fatores além do grupo genético estão relacionados a resistência à babesias. Os sinais clínicos são de anemia hemolítica com hemoglobinúria (típica na infecção por *B. bigemina*) e a patogenicidade varia de acordo com a amostra e tamanho do inóculo (RADOSTITIS et al., 2008; FARIAS, 1995; TAYLOR, 2010). Sinais menos comuns incluem edema, ascite, disfunção do sistema nervoso central, falha renal, rabdomiólise, estomatite e gastroenterite (FRY & MCGAVIN, 2013).

Na necropsia e no histopatológico os achados são típicos de anemia hemolítica e podem incluir congestão da substância cinzenta do encéfalo com presença do parasita no interior de capilares (SCHILD et al., 2008; FRY & MCGAVIN, 2013; RODRIGUES et al., 2005; ANTONIASSI et al., 2009). O exame microscópico é o método diagnóstico padrão quando bovinos clinicamente afetados são examinados (COSTA-JUNIOR et al., 2006). O ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) permite a detecção de anticorpos anti-babesia e é o método de diagnóstico indireto mais utilizado (MACHADO et al., 1997). A PCR (Reação em cadeia da polimerase) apresenta alta sensibilidade e especificidade e possibilita detectar a presença do

parasita em um número maior de animais (RADOSTITIS, 2008; BILHASSI, 2016). A qPCR é uma técnica que pode ser utilizada no estudo da babesiose com finalidades para estudo genético quantitativo, na resposta a medicamentos e para avaliação de prevalência (SANTANA, 2016).

2.3.2 Anaplasmosose

Anaplasmosose é uma doença endêmica em bovinos de regiões tropicais e subtropicais pelo grande número de vetores. É causada pelas rickettsias *Anaplasma marginale* e *A. centrale* (KOCAN et al., 2010). De maior importância patogênica para bovinos destaca-se *A. marginale* (VIDOTTO & MARANA, 2001). São parasitas intracelulares e causam infecção através de vetores biológicos como artrópodes e carrapatos da família *Ixodidae* e moscas da família *Tabanidae*, vetores mecânicos diversos, transfusões de sangue e por via transplacentária (RADOSTITIS et al., 2002a; KOCAN et al., 2010; GIRARDI et al., 2012). Em função da elevada casuística, existe no Brasil estudos sobre a prevalência do agente com variações de acordo com a espécie e região estudada (BARROS et al., 2005; JUNIOR et al., 2008; CORRÊA et al., 2011; COSTA et al., 2013; DA SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2013; CANEVER et al., 2014; DA SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Os sinais clínicos são de anemia hemolítica extravascular e a hemoglobinúria é observada em casos em que há infecção concomitante por babesias (RADOSTITIS et al., 2002b; BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010). Os achados de necropsia e histológicos são típicos de doença hemolítica (FRY & MCGAVIN, 2013). O diagnóstico pode ser realizado através do esfregaço sanguíneo corados por Giemsa, e apresenta limitações de acordo com a fase em que o parasita se encontra (OKASI et al., 2002; CARELLI et al., 2007). As técnicas sorológicas de ELISA e PCR são bastante utilizadas em estudos epidemiológicos e como medidas profiláticas (SOUZA et al., 2000; SOARES, 2000; OSAKI et al., 2002; BOCK et al., 2004) com a PCR apresentando maior sensibilidade e usada para identificar animais com baixos níveis de parasitemia (FRY & MCGAVIN, 2013).

2.3.3 Leptospirose

A leptospirose é causada por bactérias móveis, delgadas, espirais e gram-negativas (LEVETT & HAAKE, 2010), existindo cerca de 25 sorogrupos patogênicos antígenicamente e mais de 250 sorovariedades (CIANCIOLO & MOHR, 2016). Se mantém na natureza por infecção renal crônica de animais portadores, como roedores (principais), pequenos mamíferos, animais de produção e domésticos (LEVETT & HAAKE, 2010). Os reservatórios naturais de leptospirosas patogênicas em animais que sobrevivem a infecção são os túbulos contorcidos proximais do rim e o trato genital (CIANCIOLO & MOHR, 2016). Ambientes quentes e úmidos e solos alagados são ideais para a sobrevivência das leptospirosas por semanas ou até meses.

A porta de entrada é por membranas mucosas, abrasões de pele, inalação de aerossóis, contato com urina, descargas de aborto, leite, placentária e de forma venérea (FRY & MCGAVIN, 2013; CIANCIOLO & MOHR, 2016; LOUREIRO et al., 2016). No Brasil a zoonose é endêmica e de maior ocorrência em épocas chuvosas (CASTRO et al., 2011) com a prevalência alta no Maranhão (SILVA et al., 2011; PAIXÃO et al., 2016), São Paulo (LANGONI et al., 2000), Amazônia (HOMEM et al., 2001; AGUIAR et al., 2006), Mato Grosso do Sul (PELLEGRIN et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2009), Goiás (JULIANO et al., 2000), Minas Gerais (SILVA et al., 2016), Paraíba (LAGE et al., 2007), Pernambuco (OLIVEIRA et al., 2001; ROLIM, 2013) e Rio de Janeiro (LILENBAUM & SOUZA, 2003). Os sinais clínicos são de hemólise e incluem hemoglobinúria, hematúria com ou sem a presença de coágulos de sangue no trato urinário, dispneia e ocasionalmente meningite. Os pulmões podem estar pálidos e edemaciados, e pode haver lesões de hipóxia em rins e fígado (CIANCIOLO & MOHR, 2016). Entre os achados macroscópicos e microscópicos inclui-se hemorragia hepática e os rins podem apresentar nefrite intersticial crônica e ativa (FRY & MCGAVIN, 2013; CIANCIOLO & MOHR, 2016). Leptospirosas são vistas em grande número no fígado após coloração especial com Prata como Warthin-Starry (FRY & MCGAVIN, 2013). Métodos moleculares como a PCR são rápidos e sensíveis, realizados a partir de amostras de urina ou tecido, mas não são aplicáveis universalmente a todos os serotipos (LEVETT, 2001).

2.3.4 Tripanossomíase

A tripanossomíase é causada por *Trypanosoma (Duttonella) vivax* e afeta principalmente ungulados domésticos e selvagens (BOWMAN, 2009; BATISTA et al., 2012). A transmissão na América do Sul pode ocorrer através de insetos hematófagos (espécies Tabanidae e Stomoxyidae) ou artificialmente por agulhas contaminadas (SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2008). No Brasil a primeira infecção natural por *T. vivax* foi relatada no Estado do Pará em Búfalos (LOSOS & IKEDE, 1972), posteriormente em bovinos no Pantanal do Mato Grosso (SILVA et al., 1996), pantanal do Mato Grosso do Sul (DÁVILA & SILVA, 2000), sertão da Paraíba (BATISTA et al., 2007), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010) e São Paulo (CADIOLI et al., 2012). Infecções em bovinos são esporádicas em áreas endêmicas do Brasil como o pantanal, mas o parasita está se difundindo em todo território nacional principalmente nas regiões Sul e no Nordeste, causando doença em bovinos, cabras, ovelhas e mais raramente em cavalos (BATISTA et al., 2007; DA SILVA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012).

Os sinais clínicos são de anemia sem hemoglobinúria, perda de peso, anorexia, depressão, hipoglicemia, e sinais nervosos caracterizados por incoordenação, tremores musculares, salivação, nistagmo, tetania, bruxismo, cegueira transitória ou permanente, e hipermetria. (COETZER et al., 1994; GARCÍA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; CADIOLI et al., 2012). Os achados de necropsia mostraram aumento de linfonodos, baço, hidropericárdio, petéquias e equimoses no epicárdio (BATISTA et al., 2008). Histologicamente os achados são de hiperplasia de folículos linfóides em baço e linfonodos, eritrofagocitose e hemossiderose, meningite e encefalite, por vezes malácia.

Fígado com infiltrado inflamatório mononuclear nos espaços porta, hiperplasia das células de *Kupffer*, necrose centrolobular moderada e hemossiderose (RODRIGUES et al., 2005; BATISTA et al., 2008). A análise de sangue fresco corado por Panótico rápido através de microscopia direta é um método de diagnóstico adequado na fase aguda da doença (CARVALHO et al., 2008), já na fase crônica da doença pode-se fazer a detecção de anticorpos de *T. vivax* pelo método de Imunofluorescência indireta (SILVA et al., 2004; ABRAÃO et

al., 2009). Avaliações sorológicas através de ELISA, técnicas de coloração por Imunohistoquímica (IHQ) e técnicas moleculares de PCR também podem ser realizadas para detecção de anticorpos do parasita (RODRIGUES et al., 2005).

2.3.5 Hemoglobinúria bacilar

A hemoglobinúria bacilar chamada de “*Red Water Disease*”, é uma doença hemorrágica que acomete bovinos e pequenos ruminantes através da ação das toxinas β e fosfolipase C do *Clostridium haemolyticum* (CARTER et al., 1995; GOMES, 2012).

A doença causa necrose, hemólise intravascular maciça e lesão capilar (CARTER, 1995; HAUER, 2004; GOMES, 2013). Regiões úmidas, baixas ou com drenagem insuficiente, e que contém caramujos do gênero *Lymnaea* (hospedeiro intermediário de fasciola hepática) são propícias, com a doença endêmica na região Sul do Rio Grande do Sul (SCHILD, 2007; GOMES, 2013; ESTIMA-SILVA et al., 2016). As bactérias se propagam através de inundações, fezes de animais portadores, restos de carcaças de carnívoros e fenos contaminados. A entrada da bactéria no fígado é através de injúria hepática (CULLEN & MACLACHLEN, 2001; SCHILD, 2007; HUSSEIN, 2013). Bovinos são acometidos em maior intensidade e ovinos, suínos e equinos esporadicamente (OAKS et al., 1997; LOBATO et al., 2007; JESSE et al., 2016). A infecção ocorre mais em animais sadios através da ingestão de esporos que adentram no fígado e em condições de anaerobiose como durante amigração de vermes trematódeos como a fasciola hepática ou após biópsias hepáticas, ocorre a germinação dos esporos e produção de toxinas (LOBATO et al., 2007; SCHILD, 2007; GOMES, 2013). Os sinais clínicos são de arqueamento do dorso com contração da musculatura abdominal e dificuldade de locomoção, respiração dificultosa, febre, hemoglobinúria, depressão, anorexia, icterícia, hipotermia e morte em até 24 horas.

Na necropsia há hemorragias intestinais, fezes sanguinolentas e com bile, icterícia, peritonite fibrinosa, esplenomegalia, urina avermelhada, áreas de infarto circulares no fígado de 5 a 20 cm, odor fétido e coloração pálida do fígado, hemorragias em membranas serosas, tecido subcutâneo e em órgãos

parenquimatosos (OAKSetal., 1997; SCHILD,2007; SHINOZUKA et al., 2011; GOMES, 2013). Histologicamente no fígado há necrose de coagulação circundadas por uma linha hemorrágica, e ao centro neutrófilos degenerados e bacilos Gram positivos. Nota-se ainda eritrofagocitose de células de *Kupffer*, necrose de coagulação do epitélio tubular renal, hemorragia e edema na pelve renal(OAKSet al., 1997;HUSSEIN, 2013). Para fins diagnósticos os esfregaços de lesões hepáticas são melhores para a realização de coloração de Gram e provas de Imunofluorescência. Pode-se fazer ainda a detecção da toxina ou isolamento do agente em amostras de sangue ou tecido, e análise molecular por PCR (SHINOZUKA et al., 2011; GOMES, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2008 a 2016 nove surtos de doença hemolítica em bovinos foram acompanhados pelas equipes do LPV-UFMT e do LAPAN-UFMT, com oito destes ocorrendo no Estado de Mato Grosso e um em Rondônia. As propriedades em que ocorreram os surtos foram enumeradas em ordem crescente de acordo com a sequência cronológica (Surto 1 à 9), assim como os animais examinados (Bovino 1 à 18). Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos junto aos proprietários e/ou médicos veterinários que atenderam as propriedades e em visitas realizadas pelas equipes durante os surtos 1, 3, 4, 7 e 9. Adicionalmente, em 2016 as propriedades foram contatadas novamente com o objetivo de avaliar os surtos e averiguar a recorrência da doença. Destas, cinco propriedades (1, 3, 4, 5, 9) foram revisitadas.

Dos nove surtos acompanhados, 18bovinos foram acompanhados clinicamente e 15 bovinos foram submetidos à necropsia. Alterações macroscópicas foram anotadas e fragmentos de tecidos foram coletados, fixados em formol a 10%, e processados pelas técnicas histológicas rotineiras (PROPHET et al., 1992), coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscopia óptica.

Adicionalmente, foram realizadas as seguintes técnicas de colorações especiais em todos os casos: ácido rubeânico para detecção de cobre em lâminas histológicas de fígado e rim; Warthin-Starry para detecção de espiroquetas de *Leptospira sp.* em lâminas de rim e a técnica de *Perls* para marcação de

hemossiderina em lâminas de fígado e baço (PROPHET et al., 1992). Testes de hemograma foram realizados com amostras de sangue de 8 bovinos dos surtos 4,7 e 9 através do método da contagem automática de células, com a utilização do aparelho VET ABC-TM Micros 60, com cartão de leitura de hematócrito para bovinos. Análise de esfregaço sanguíneo com amostras de sangue de 14 bovinos dos surtos 1,2,3,4,7,8 e 9 foi realizada para análise morfológica celular e leucometria diferencial. Esfregaços de sangue total de amostras de sangue de 14 bovinos dos surtos 1,2,3,4,7,8 e 9 foram processados pela técnica do microhematócrito (WOO,1970; BATISTA et al., 2008), corados com Panótico, e analisados por microscopia direta para pesquisa de *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp..

Exames séricos de ureia, creatinina e dosagem enzimática foram realizados com amostras de urina de 6 bovinos dos surtos 4 e 9 utilizando kits da Bioclin e procedeu-se de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de urina de 6 bovinos dos surtos 4 e 7 foram analisadas pelo método de urinálise para observação de caracteres físicos macroscópicos, pesquisa semi-quantitativa e sedimentoscopia microscópica quantitativa, e por avaliações através de fita reagente (Hemagen). A diferenciação entre mioglobínúria e hemoglobínúria foi realizada com amostras de urina de 4 bovinos dos surtos 4 e 8 pela técnica qualitativa do sulfato de amônio. Foram adicionados 2,8g de sulfato de amônio em 5 ml de urina, com posterior centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e 5 minutos em repouso, com a passagem de uma fita reagente (Hemagen) no filtrado (LOPES, 2007).

DNA foi extraído a partir de amostras de 250 µl de sangue pertencentes a 5 bovinos dos surtos 2, 3, 4, 5 e 9 usando o método padrão fenol - clorofórmio e precipitação com etanol (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e também a partir de amostras de rim, fígado e baço dos mesmos bovinos, fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina, de acordo com a técnica descrita por Shi et al., (2004). O DNA obtido foi analisado em eletroforese com gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 1989). As amostras de DNA extraídas foram testadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., e *Leptospira* spp.. Na detecção do gênero *Anaplasma* foi utilizado o primer GE2'F2' e HE3 de acordo com protocolo

descrito por Melo et al. (2016). Para o gênero *Babesia* foi utilizado o gene 18S de acordo com o descrito por Almeida et al.(2012). Para *Trypanosoma* spp. o protocolo utilizado foi de acordo com Cortez et al. (2009), utilizando o kit GFXtm PCR DNA.

Para *Leptospira* spp.foram utilizados os primers LipL32-45F e LipL32-286R desenhados por Stoddard et al., (2009) que tem o gene LipL32 como alvo específico para leptospiras patogênicas.

4.RESULTADOS

4.1 Epidemiologia e sinais clínicos

No Estado de Mato Grosso as propriedades acometidas estão situadas no município de Juína (Surto 1 e 8), Porto dos Gaúchos (Surto 3 e 4), Nova Ubiratã (Surto 5), Matupá (Surto 6), Feliz Natal (Surto 7) e Terra Nova do Norte (Surto 9).No Estado de Rondônia a propriedade acometida situa-se no município de Nova Mamoré (Surto 2).A localização dos municípios nos estados de Mato Grosso e Rondônia está elucidada na Figura 1.

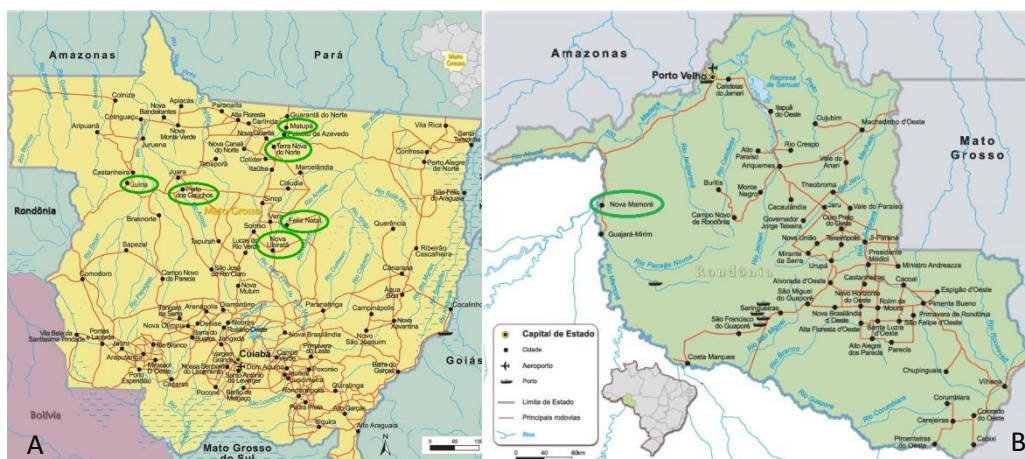


Figura 1. A. Mapa do Estado de Mato Grosso. Em destaque (circulo verde) estão os municípios de Juína, Porto dos Gaúchos, Nova Ubiratã, Matupá, Feliz Natal, e Terra Nova do Norte. B. Mapa Do Estado de Rondônia. Em destaque (Circulo verde) está o município de Nova Mamoré. Fonte: Mapa-base: IBGE.

Todas as propriedades se localizam nas regiões do bioma Amazônico e de transição Cerrado-Amazônia e mantinham sistema de criação extensiva de bovinos da raça nelore, com predomínio das fases de cria e recria. Nos Surtos 1, 2, 3, 5, 6 e

7 a doença ocorreu em bovinos mantidos em um mesmo piquete. Nos Surtos 4 e 8 os bovinos acometidos estavam em dois piquetes e no Surto 9 os bovinos foram mantidos em três piquetes diferentes afetados. O tamanho dos piquetes variavam de 50 a 750 hectares. Em todas as propriedades onde ocorreram os surtos, os piquetes eram formados por braquiária (*Urochloa* spp.) com graus variados de degradação, ou sem degradação, com moderada à intensa quantidade de plantas daninhas e nas propriedades dos Surtos 5, 6 e 9 era realizado consórcio lavoura/pecuária. A vegetação invasora era composta por plantas comuns as regiões de mata de transição Cerrado-Amazônia e de Mata Amazônica, com especial destaque a planta *Pleonotoma mieloides* (Figura 2). Essa planta foi observada em todas as propriedades e com sinais de consumo pelos bovinos, mesmo quando havia boa disponibilidade de pastagem. Em nenhuma propriedade foram observadas plantas já descritas como hemolíticas como *Brachiaria radicans*, *Allium cepa*, *Ditaxis desertorum* e *Indigofera suffruticosa*.



Figura 2: *Pleonotoma mieloides* em beira de mata na propriedade do Surto 4 em Porto dos Gaúchos – MT. Pertencente a família das Bignoniaceae é uma planta arbustiva com ramos glabros a esparsos-lepidoto, tetragonal, folhas tri-ternadas, ocasionalmente ternado-bipinadas (Gomes, 2006).

Os bovinos dos Surtos 3, 4, e 6 foram comprados e recém introduzidos no rebanho, e os bovinos dos demais surtos eram nativos. Ambos manifestavam sinais clínicos com 15 a 20 dias da chegada na propriedade ou da mudança dos piquetes.

Os sinais clínicos da doença eram agravados após a movimentação dos animais, e a evolução até a morte se dava entre 1 a 5 dias. Aproximadamente 429 bovinos morreram em todos os surtos acompanhados. A mortalidade variou de 0,26 a 50%, a morbidade foi de 0,57 a 67,11% e a letalidade apresentou variação de 22 a 100%. Os surtos da doença ocorreram nos meses de outubro a junho, com maior ocorrência no mês de outubro. Proprietários e veterinários das propriedades acometidas relatavam que outros casos de mortalidade com sinais clínicos semelhante ocorreram em diversas ocasiões em propriedades vizinhas ou próximas. Informações epidemiológicas detalhadas estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos surtos de bovinos diagnosticados com anemia hemolítica no período de 2008 a 2016.

Surto	Local	Rebanho total	Bovinos no lote	Bovinos mortos	Mortalidade (%)	Nº necropsias	Idade (M/A)	Sexo M/F	Pastagem	Invasão plantas daninhas	Cons. Lavoura/pecuária	Manejo do piquete após o surto	Mês/Ano primeiro diagnóstico
1	Juína-MT	600	140	12	8,57	2	3 anos	0/2	<i>Urochloaspp.</i>	++	Não	Roçagem	Jun/2008
2	Nova Mamoré-RO	500	300	25	8,33	1	Adulto	0/1	<i>Urochloaspp.</i>	+++	Não	Queima	Out/2012
3	Porto dos Gaúchos	1.400	700	40	5,71	1	Adulto	0/1	<i>Urochloaspp.</i>	+++	Não	Lavoura	Jun/2012
4	Porto dos Gaúchos-MT	10.000	149	22	14,76	4	6 M á 8 A	0/3	<i>Brachiaria</i> híbrida(Convert™ HD 364	++	Sim	Nenhum	Out/2013
5	Nova Ubitatã-MT	10.334	450	3	0,67	2	5 A	0/2	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	+	Sim	Lavoura	Out/2013
6	Matupá-MT	1.200	500	250	50,00	1	2 A	1/0	<i>Urochloaspp.</i>	++	Sim	Lavoura	Dez/2013
7	Feliz Natal-MT	1.500	100	4	4,00	1	Adulto	0/4	<i>Urochloaspp.</i>	+++	Não	Roçagem	Fev/2014
8	Juína-MT	5.000	100	50	50,00	1	Adulto	0/4	<i>Urochloaspp.</i>	++	Não	Lavoura	Mar/2014
9	Terra Nova do Norte-MT	3.700	90	23	25,55	2	Adulto	0/2	<i>Brachiaria brizanta</i> cv.piatã	+++	Sim	Roçagem	Abr/2016

M/F: macho/fêmea; M/A: mês/ano; Nº: número; (+): leve; (++) : moderada; (+++) : intensa; Cons.: consórcio. Fev: fevereiro; Mar: março; Abr: abril; Jun: junho; Out: outubro; Dez: dezembro.

Em todos os surtos os sinais clínicos eram semelhantes e caracterizavam-se inicialmente por palidez de mucosas (16/18 bovinos), icterícia evidente nas mucosas oral e ocular, por vezes em glândula mamária e tetos (11/18), debilidade acentuada (15/18), febre intermitente (8/18) e, com a evolução da doença havia ainda apatia, agressividade (8/18) tremores musculares acentuados (14/18), anorexia (8/18). Todos os bovinos avaliados apresentavam urina de coloração escura. Frequentemente havia manifestações de agressividade (8/18), além de decúbito. A evolução da doença incluía uma fase agônica final, onde a morte era de caráter agudo. Tratamento de suporte como fluidoterapia foi realizado nos bovinos dos Surtos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9, porém sem sucesso na recuperação. Os bovinos foram trocados de piquetes quando se iniciaram as mortes em todos os surtos. Durante a movimentação houve a morte de alguns animais que estavam em estado mais grave. Após serem removidos alguns bovinos se recuperavam em poucos dias, porém ainda foram registradas mortes nos Surtos 2, 4, 6 e 8, por um período de até 15 dias. Nos Surtos 1, 7 e 9, a introdução de novos animais foi realizado após roçagem das pastagens, no Surto 2, após queima das pastagens e no Surto 4 não foi realizado nenhum manejo. Em todos os casos de reintrodução dos bovinos, nenhuma manifestação clínica foi observada. A recorrência da doença não foi relatada em nenhum caso, com exceção da propriedade do Surto 4 em que relatos de funcionários indicam que um ano após o surto, alguns bovinos morreram com quadro clínico semelhante. Nas propriedades dos Surtos 3, 5, 6 e 8, as pastagens foram substituídas por lavoura no ano subsequente, não havendo mais a criação de bovinos nestas áreas.

4.2 Avaliação anatomopatológica

Quinze bovinos foram submetidos à necropsia com mínimo de um e máximo de quatro animais por surto. Ao exame macroscópico notou-se baixo escore corporal (5/15), mucosas ocular, oral e genital com palidez acentuada (3/15) ou moderada icterícia (6-15), a qual por vezes também era evidente na pele do úbere (3/15). Quatro bovinos apresentavam sangue de coloração amarronzada com perda da

viscosidade e baixa coagulação. Havia ainda leve a moderada icterícia do tecido subcutâneo e camada serosa de vísceras abdominais e torácicas (6/15). No fígado se observou aumento de volume (4/15), consistência friável (4/15) coloração escura(4/15), ou amarelada (6/15) e evidenciação do padrão lobular (5/15) (Figura 3 A).A superfície de corte mostrou-se intensamente amarela com áreas avermelhadas (6/15). A vesícula biliar estava repleta e com moderado edema de parede (8/15).Os rins apresentavam aumento de volume (3/15) e coloração marrom escura (9/15) (Figura 3, B),apresentando ainda tumefação moderada (4/15), por vezes com áreas de depressão da superfície capsular (2/15). A bexiga continha urina de cor vermelho escuro (12/15) (Figura 3, C), e o baço estava aumentado até duas vezes o seu tamanho (4/15).

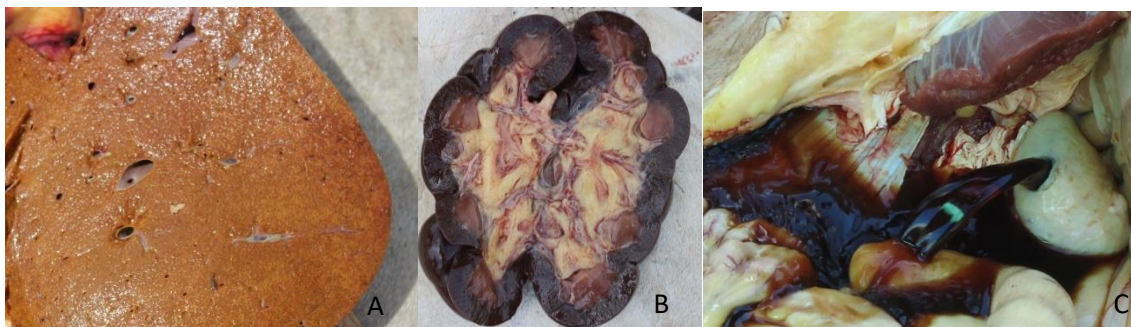


Figura 3: Alterações macroscópicas observadas em bovinos com anemia hemolítica tóxica. A. Fígado do Bovino 3 de coloração amarelada difusa com evidenciação do padrão lobular. B. Rim aumentado de volume e de coloração escura. C. bexiga contendo urina fortemente enegrecida.

Histologicamente as lesões no fígado eram caracterizadas por necrose hepatocelular paracentral (13/15), e ocasionalmente centrolobular (9/15). Circundando as áreas de necrose haviam hepatócitos tumefeitos e vacuolizados (8/15), além de infiltrado linfoplasmocitário discreto e multifocal (2/15), (Figura 4).

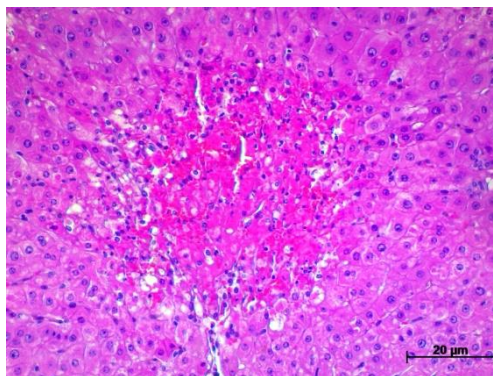


Figura 4: Fígado com necrose centrolobular, hepatócitos tumefeitos e infiltrado linfoplasmocitário, HE, 20x.

Pericolangite linfoplasmocitária leve e multifocal (7/15) foi observada associada à discreta quantidade de macrófagos espumosos (4/15). Colestase canalicular moderada e multifocal foi observada em 4 casos. Nos rins as lesões foram de nefrose hemoglobinúrica caracterizada por degeneração (7/15) e necrose moderada de túbulos uriníferos (11/15) com células tubulares com o núcleo picnótico, citoplasma tumefeito e vacuolizado (6/15), por vezes eosinofílico (4/15) material hialino na luz de túbulos (12/15) (Figura 5 A e B), além de áreas focais de calcificação no interstício (1/15) e infiltrado linfoplasmocitário moderado intersticial (6/15). Por fim, no baço havia grande quantidade de substancia castanho claro, caracterizada por hemossiderina dispersa em grande quantidade pelo parênquima, além de discreta quantidade de macrófagos espumosos (7/15), (Figura 6). Nas técnicas de coloração especial do Ácido Rubeânico e Warthin-Starry todos os 15 casos testados apresentaram resultados negativos para marcação por traços de cobre em cortes histológicos de fígado e rim, como também para a presença de espiroquetas de *Leptospira spp.* em cortes histológicos de rim. Na análise qualitativa por método histoquímico com o Azul da Prússia (Reação de *Perls*) em fragmentos histológicos de fígado e baço todos os 15 casos testados apresentaram marcação fortemente positiva para a presença de hemossiderina.

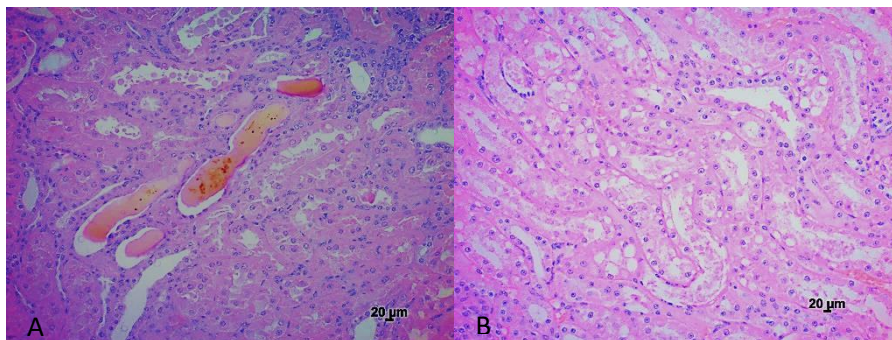


Figura 5: A. Rim com material eosinofílico hialino no interior de túbulos. B. Rim com degeneração e necrose de túbulos uriníferos, evidenciada por núcleo picnótico e citoplasma tumefeito e vacuolizado, HE, 20x.

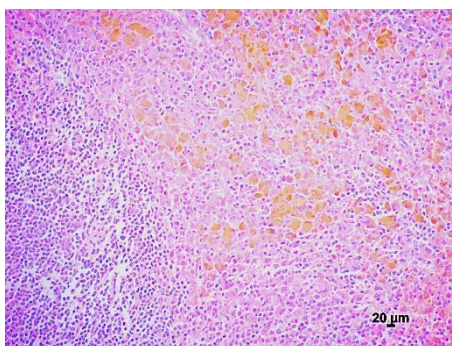


Figura 6: Baço com grande quantidade de substância castanho claro caracterizada por hemosiderina dispersa pela parênquima, HE, 20x.

4.3 Exames complementares

Na análise do Eritrograma dos bovinos avaliados dos Surtos 4, 7 e 9 a quantidade de eritrócitos, e as porcentagens de hemoglobina e hematócrito apresentaram valores muito abaixo do padrão de normalidade para a espécie (WEISS, 2011) demonstrando quadro clínico de anemia. O VCM (Volume Corpuscular Médio), o CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média) e as plaquetas apresentaram valores dentro da normalidade. Os valores dos leucócitos e neutrófilos segmentados apresentaram valores acima da normalidade. A técnica qualitativa do Sulfato de Amônio apresentou resultado positivo para a presença de hemoglobina nas quatro amostras de urina do Surto 4 evidenciando hemoglobinúria.

Avaliações da urina de dez bovinos dos Surtos 3, 4, 7 e 9, através de fita reagente (Hemagen ®) revelaram pH ácido e presença de glicose e leucócitos em quantidade leve. Na urinálise dos Surtos 4, 7 e 9 a coloração da urina apresentou-se mais escurecida em todas as amostras avaliadas, com aspecto predominantemente turvo. O pH ácido foi notado somente em uma das amostras de urina avaliadas. Na pesquisa semi-quantitativa a presença de proteínas e sangue na urina foi encontrada em quantidades significativas nas amostras analisadas. Na sedimentoscopia microscópica quantitativa a quantidade de eritrócitos apresentou valores acima da normalidade. Na análise de enzimas hepáticas, observou-se que Gama glutamiltransferase (GGT), Creatinofosfoquinase (CK), Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA), como também a Bilirrubina total apresentaram valores muito acima da normalidade. Essas enzimas são de grande uso na rotina clínica, em particular GGT na avaliação de colestase, CK na avaliação de danos hepáticos e Bilirrubina total sendo usada na avaliação de danos hepáticos e com maior elevação em crises hemolíticas (KANEKO,2014).Albumina e Desidrogenase láctica (LDH) apresentaram valores abaixo da normalidade. Com relação aos valores de Uréia e Creatinina houve divergências, notando-se aumento em determinados casos e diminuição em outros. Dados detalhados a respeito do hemograma, urinálise, exames bioquímicos e enzimas hepáticas estão sumarizados na Tabela 2. Na pesquisa por hematozoários como *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.* e de *Trypanossoma sp* realizados em 14 bovinos dos 9 Surtos o resultado foi negativo. Nas técnicas de PCR realizadas para detecção de *Trypanossoma spp.*, *Babesia spp.* e *Anaplasma spp.* em amostras do DNA extraído de órgãos de três bovinos correspondentes ao surtos 2, 4 e 5 não houve a detecção destes agentes. Nas técnicas de PCR realizadas para detecção de *Leptospira spp.* em três bovinos dos surtos 3 e 9 o resultado foi negativo.

Tabela 2. Resultados de hemograma, enzimas hepáticas, exames bioquímicos e urinálise de bovinos diagnosticados com Anemia hemolítica pelo LPV/LAPAN da UFMT de 2008 a 2016.

ERITROGRAMA	Bov.5	Bov.6	Bov.7	Bov.8	Bov.12	Bov.13	Bov.14	Bov.15	Bov.17	Bov.18	PN*
He *(µL)	1.40	2.23	1.46	NR	1.64	1.98	2.09	NR	1.86	1.89	5-10
Hb (g/dL)	2	5.20	2	NR	4.1	3.9	4.6	NR	3.2	3.4	8-15
Ht (%)	6	14	6	NR	11.36	12.80	12.50	NR	9.18	9.51	24-46
VCM (fL)	42.86	62.78	42.92	NR	69	65	60	NR	49	50	40-60
CHGM (%)	33.33	37.14	14.29	NR	36.02	30.04	36.09	NR	34.08	36	30-36
Plaquetas (µL)	394	442	396.00	NR	772	346	258	NR	609	347	200-80
LEUCOGRAMA											
Leucócitos totais (µL)	9.400	26	9.300	NR	20.430	13.710	15.760	NR	14.370	13.030	4.000-12.000
Neutrófilos segmentados(µL)	7.708	8.840	6.500	NR	10.827	7.951	8.195	NR	9.340	10.424	2.500-7.500
ENZIMAS HEPÁTICAS/EXAMES BIOQUÍMICOS											
G.G.T (UI/L)	61	122	482	87	NR	NR	NR	NR	280	290	6.1-17.4
C.K. (UI/L)	1219	1311	3448	1297	NR	NR	NR	NR	NR	NR	4.8-12.1
A.L.T.(UI/L)	120	141	199	112	NR	NR	NR	NR	NR	NR	11-40
Fosfatase alcalina (UI/L)	132	124	240	127	NR	NR	NR	NR	713.20	287.40	0-488
Albumina (g/dl)	2.10	1.70	2.30	1.50	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3.3-3.55
Bilirrubina total (mg/dl)	5.20	6.60	6.20	6.30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0.01-0.5
Uréia (mg/dl)	56	54	109	112	NR	NR	NR	NR	65	70	48.2-64.2
Creatinina (mg/dl)	2	1.40	4.00	1.70	NR	NR	NR	NR	1.9	2.1	1-2
LDH (UI/L)	898	340	NR	560	NR	NR	NR	NR	NR	NR	692-1445
URINÁLISE											
Cor	CA	CA	CA	V	NR	AP	NR	CA	NR	NR	Amarelo-palha à âmbar claro
Aspecto	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	NR	Límpido	NR	Lig. turvo	NR	NR	Transparente á límpido
Densidade	1018	1030	1026	1015	NR	1002	NR	1016	NR	NR	1015-1045
Ph	9	9	9	8	NR	8.5	NR	5.5	NR	NR	7.5-8.5
Proteínas	+	Ausente	+	+++	NR	+	NR	+++	NR	NR	Ausente
Sangue	+++	Ausente	+++	++++	NR	++	NR	++++	NR	NR	Ausente
Hemácias (campo 40x)	20	Ausente	3	30	NR	10	NR	20	NR	NR	1 a 2/campo
Flora bacteriana	++	++	++	+	NR	++	NR	++++	NR	NR	Discreta

He: hemácias **Ht:** hematócrito **Hb:** hemoglobina **VCM:** volume corpuscular médio **CHGM:** concentração de hemoglobina globular média. **B.5:** bovino 5, **B.6:** bovino6, **B.7:** bovino 7, **B.4:** bovino 4, **B.8:** bovino 8, **B.12:** bovino 12. **B.13:** bovino 13 **B.14:** bovino 14 **B.15:** bovino 15 **B.17:** bovino 17. **B.18:** bovino 18. (+): traços, (++)leve, (+++): moderado, (++++): intenso. *valores de referência. **N** : não realizado. **IFD:** Imunofluorescência direta (imprint rim). **hemog:** positivo hemoglobina. PN*: padrão de normalidade segundo Weiss (2011), Lopes et al. (2007). **CA:** castanho. **AP:** amarelo pálido. **V:** vermelho. **Lig.:** ligeiramente.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de anemia hemolítica intravascular nos bovinos dos surtos relatados foi realizado por avaliação clínica e patológica dos animais acometidos e confirmada pelos exames hematológicos. As causas de anemia hemolítica em bovinos já relatadas no Brasil foram investigadas e descartadas. Desta forma acredita-se que a doença seja causada por uma planta hemolítica ainda não identificada. A infecção por *Leptospira sp.* foi descartada devido aos resultados negativos na técnica de PCR e na coloração especial para detecção de espiroquetas no rim. Além disso, os históricos dos casos não informaram alterações reprodutivas frequentes nessa doença (OLIVEIRA et al., 2003; SANDOW & RAMÍREZ, 2005). Quanto a hematozoários, a infecção por *Babesia spp.* e *Anaplasma Marginale* foi excluída, pois, além dos casos analisados não apresentarem lesões patológicas compatíveis com essas infecções (SMITH, 2006), a pesquisa destes hemocitozoários por esfregaços de sangue apresentaram resultados negativos nas amostras analisadas. Adicionalmente o exame de PCR de órgãos de animais acometidos foi negativo à presença destes agentes. Tripanossomíase foi testada e descartada pelos testes de microhematocrito e de PCR. Nos casos estudados não foram observadas alterações no leucograma compatíveis com tal infecção e ainda não foram observados sinais neurológicos, lesões em meninges (BATISTA et al., 2008; BATISTA et al., 2011) ou desordens reprodutivas (SILVA et al., 2004; CADIOLI et al., 2012; SILVA et al., 2013) frequentemente relatadas nessa enfermidade. A suspeita de Hemoglobinúria bacilar foi descartada pela ausência de lesões características dessa doença no fígado (SCHILD et al., 2008), além da ausência de fascíola ou outros parasitas no órgão (CULLEN & STALKER, 2016). Hematúria enzoótica não foi cogitada devido a ausência de alterações vesicais de origem neoplásica (RIET-CORREA et al., 2001; GABRIEL et al., 2009; GALVÃO et al., 2012; FURLAN et al., 2014) e baixa porcentagem ou ausência de infestação das pastagens por *Pteridium arachnoideum* e *P. caudatu* nas propriedades onde os surtos ocorreram (FURLAN et al., 2014). A intoxicação por cobre foi descartada através da coloração do Ácido Rubeânico que não evidenciou o mineral em tecidos dos animais acometidos. Das plantas tóxicas causadoras de anemia hemolítica descritas no Brasil nenhuma delas foi observada nas propriedades em que

ocorreram os surtos. Dentre elas estão, *Allium cepa*, que não é cultivada nas regiões onde ocorreram os surtos, *Brachiaria radicans*, que ocorre somente em áreas alagadas no Pantanal Matogrossense e *Ditaxis desertorum* e *Indigofera suffruticosa* freqüentes na região nordeste do país, e não relatadas nos Estados de Mato Grosso e Rondônia. As manifestações clínicas e patológicas da doença aqui estudada são bastante semelhantes às relatadas nas intoxicações pelas plantas supracitadas e são caracterizadas por quadro de anemia hemolítica aguda, com palidez ou icterícia de mucosas, urina de coloração vermelho escura, assim como fígado e rins que também apresentam coloração vermelho escuro, que correspondem à hemoglobinúria, à necrose de hepatócitos das regiões centrolobular e paracentral e nefrose hemoglobinúrica com proteinúria, respectivamente (TOKARNIA et al., 1997; BORELLI et al., 2009; GAVA et al., 2010; SALVADOR, 2010; FIGUEIREDO et al., 2012). Nos surtos acompanhados, aproximadamente 429 bovinos morreram. A morbidade e mortalidade variaram consideravelmente, com índices de 0,57 a 67,11% e 0,26 a 50%, respectivamente. Já a letalidade apresentou variação de 22 a 100%. Consideráveis perdas econômicas são observadas nesses casos, não somente atribuídas às mortes destes bovinos, mas também à gastos com contratação de médicos veterinários e compra de medicamentos, que na maioria das vezes não são utilizados em função da rápida progressão da doença. Quanto aos animais afetados, não foi observado predileção por idade ou sexo, contudo, a maior parte dos bovinos afetados foram fêmeas adultas, isso devido ao fato das propriedades acometidas possuírem sistema de cria e recria. Adicionalmente, as nove propriedades mantinham sistema de criação extensiva de bovinos da raça nelore. Em todos os piquetes onde ocorreu a doença, as pastagens eram recém-formadas e compostas por *Brachiaria spp.* com graus variados de degradação e com leve a intensa invasão por plantas comuns as regiões de Mata Amazônica e transição Cerrado-Amazônia. Esses piquetes frequentemente faziam divisa com áreas mata, ou ainda apresentavam sistema de integração lavoura-pecuária o que favoreceu o contato dos bovinos com plantas tóxicas. Além disso, os casos de anemia hemolítica aconteceram nos meses de outubro a junho, com maior prevalência no mês de outubro, época que corresponde ao início das chuvas nessas regiões e coincide com a brotação de forragens e plantas daninhas. Durante

inspeção de pastagens realizadas em visitas às propriedades um fato comum a todos os casos era a presença da planta *Pleonotoma melioides*, conhecido popularmente por “cipó-quatro-quinas. Tal planta, no momento dos surtos estava em fase de brotação e apresentava sinais de consumo pelos bovinos, mesmo em locais onde havia boa disponibilidade de pastagem, demonstrando boa palatabilidade da planta e talvez maior toxicidade na fase de brotação. Tais indícios levam a crer que esta planta pode estar associada aos casos de intoxicação e estudos adicionais serão realizados na tentativa de reprodução experimental da doença através da administração da planta. Outro fato comum nos surtos é que eles ocorreram em poucos piquetes, sendo que em seis casos, ocorreram somente em um piquete na propriedade. Além disso, os sinais clínicos iniciavam-se poucos dias após a troca de pasto ou introdução de novos bovinos nas áreas. Tal fato pode estar relacionado ao primeiro contato dos animais com a planta, ou com período de estresse e fome vivido por esses animais em momento anterior. Tal característica é vista em algumas intoxicações, como no caso de *Brachiaria radicans* (GAVA et al., 2010). Após as primeiras mortes, em todos os casos os bovinos foram trocados de pasto. Com essa movimentação, houve a precipitação de algumas mortes e os animais com quadro clínico mais grave morreram por um período de até 15 dias. Entretanto, os demais animais se recuperaram em poucos dias. Essa recuperação após remoção dos animais da área afetada ou mesmo com a continuidade da ingestão da planta é frequentemente relatada em casos de intoxicação por plantas hemolíticas, como *Ditaxis desertorum*, *Indigofera Suffruticosa* e *Brachiaria radicans* (TOKARNIA e. al., 1997; BARBOSA NETO et al., 2001; GAVA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2012) e talvez se deva a modificações da flora ruminal que se adapta para alterar a estrutura química do princípio ativo, ainda não conhecido nessas plantas. Tal recuperação corre também em bovinos intoxicados por plantas do gênero *Brassica*, que contém S-metilcisteína sulfóxido (SMCO), metabólito que no rúmen por ação de bactérias, sofre metabolização em dimetil dissulfito, que causa hemólise (CHEEKE, 1998). A recuperação da anemia em casos de intoxicação por *Brassica* ocorre, provavelmente, devido a uma adaptação parcial dos microorganismos do rumem produzindo menos dimetil dissulfito. Em cinco propriedades, novos animais foram introduzidos nos piquetes onde ocorreram os surtos, em um período de até 4 meses.

Essa introdução foi realizada após manejo de roçagem em três casos, após queima da pastagem em um e sem nenhum manejo em outro caso. Manifestação clínica da doença não foi observada em todos os casos. Acredita-se que a roçagem e a queima das pastagens tenham diminuído a infestação da planta tóxica nas áreas, e ainda, que quando esses animais foram introduzidos nos piquetes, o período mais tóxico da planta tenha passado não havendo manifestação clínica da doença mesmo naquele local em que nenhum manejo foi realizado. Nas propriedades, que não foram substituídas por lavoura e ainda mantinham bovinos nas áreas acometidas, não foi relatado a recorrência da doença, com exceção de uma única propriedade em que houve relatos de casos semelhantes, porém esses casos não foram acompanhados. É possível que a ocorrência de surtos seja limitada a variações pluviométricas, com maior desenvolvimento da planta ou mesmo maior toxidez da mesma em consequência de maior quantidade de chuvas naquelas áreas em períodos específicos. Nesse período nove surtos foram acompanhados, entretanto há relatos de casos semelhantes em várias regiões do Estado de Mato Grosso. Acredita-se que muitos outros casos ocorram, porém com a recuperação dos animais após um período, as equipes de diagnóstico não são solicitadas e os casos não são contabilizados.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, a anemia hemolítica diagnosticada em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rondônia tem considerável impacto nas localidades onde ocorrem, com índices de morbidade e mortalidade razoáveis e alto índice de letalidade. Até o momento a doença tem sua etiologia desconhecida; entretanto as evidências epidemiológicas, clínicas e patológicas sugerem que a mesma seja causada por uma planta tóxica de ação hemolítica ainda não identificada e presente nas pastagens das propriedades acometidas. Estudos adicionais com experimentação animal devem ser realizados na tentativa de identificar tal planta.

ANEXOS 1. Ficha utilizada em inquérito epidemiológico na investigação dos surtos de anemia hemolítica aplicado a proprietários durante visita a propriedades

Questionário Epidemiológico projeto Anemia hemolítica Tóxica							
Proprietário/Nome:							
Responsável:							
Fazenda:						Telefone:	
Município:						E-mail:	
Endereço:							
Tipo de exploração:							
Nº total de bovinos:			Machos:		Fêmeas:		
Idade:							
Entrevista clínica							
Vacinação:						Mortalidade de outras espécies:	
Outras espécies:	Felino ()	Equino ()	Suíno ()	Canino ()			
	Ave ()	Muar ()	Caprino ()	Ovino ()			
Origem dos bovinos:					Lesões macroscópicas:		
Nativos () Adquiridos () Há quanto tempo?							
Origem da aquisição:							
Passaram fome? Sim () Não () Tempo:							
Tempo do início até a morte:							
Histórico e Sinais clínicos observados							
Houve mudança de manejo?							
Nº de surtos bovinos	Ano	Mês	Acometidos	Tratamento	Mortos	Suspeita	Resposta ao tratamento
							Recuperação () Piora () Morte ()
							Recuperação () Piora () Morte ()
							Recuperação () Piora () Morte ()
							Recuperação () Piora () Morte ()
							Recuperação () Piora () Morte ()
Custos totais	Mortos			Obs:			
	Tratamentos	RS					
Fornecimento de ração?	Sim () Não ()	Qual?					
Suplementação mineral	Sim () Não ()	Qual?					
Correção de solo:	Adução ()	Outro () Especifique:					
Consórcio Lavoura/Pecuária:	Sim () Não ()	Qual?					
Pastagem prevalente:							
Tempo de Implantação da pastagem em anos:							
Inspeção da Pastagem							
Presença do Cipó 4 Quinas	Sim () Não ()	Intensidade?			Pastos afetados:		
Plantas daninhas:	Sim () Não ()	Intensidade?			Pastos afetados:		
Plantas tóxicas conhecidas:							

Anexo 2. Comprovante de submissão do artigo na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*

07/02/2017

ScholarOne Manuscripts

 Pesquisa Veterinária Brasileira

Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Pesquisa Veterinária Brasileira

Manuscript ID

PVB-5265

Title

Anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensiva em Mato Grosso e Rondônia

Authors

Rondelli, Leilane
Becker, Marciel
Caldeira, Flávio
Ribeiro, Marlon
Furlan, Fernando
Colodel, Edson
Pescador, Caroline
Antoniassi, Nadia

Date Submitted

07-Feb-2017

[Author Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

Anexo 3. Artigo submetido a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensiva em Mato Grosso e Rondônia

Leilane A.S. Rondelli², Marciel Becker², Flávio H. B. Caldeira², Marlon Ribeiro³, Fernando H. Furlan², Edson M. Colodel², Caroline A. Pescador², Nadia A. B. Antoniassi³

ABSTRACT.- Rondelli L.A.S., Becker M., Caldeira F.H.B., Ribeiro M., Furlan F.H., Colodel E.M., Pescador C.A & Antoniassi N.A.B. 2017. [**Hemolytic anemia in beefcattle in extensivesystem farming in Mato Grosso and Rondônia**] Anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensiva em Mato Grosso e Rondônia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso. Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Boa Esperança, Cuiabá, 78060-900, MT, Brazil. E-mail: naassi@gmail.com

Cases of hemolytic anemia in beef cattle in na extensive breeding system in Mato Grosso and Rondônia have been monitored since 2008. The affected animals presented weakness, pale or icteric mucosas, blackened urine, prostration and anorexia. The outcome of these cases often is death, principally if the animals are forced to walk. Approximately 429 cattle died in these outbreaks and in some of these, mortality rates ranged from 0.26 to 50%. Infectious causes and some toxic causes of hemolytic anemia in bovines were investigated. After histopathological examinations, special coloring, hematology, biochemistry and molecular tests, were excluded the possible causes. Any plant ready described in Brazil as cause of hemolytic anemia in animals from livestock interest was observed in those farms. Although the etiology of these cases is not yet known, clinical and pathological evidences of the disease suggested that it is caused by a toxic plant of hemolytic action, present in the affected properties, but not yet confirmed experimentally.

INDEX TERMS: hemoglobinuria, hemolytic plant, poisoning.

¹Recebido em...

²Laboratório de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso. Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Boa Esperança, Cuiabá, 78060-900, MT.

³Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Sinop, Av. Alexandre Ferronato 1200, Distrito Industrial, Sinop, MT 78550-000, Brasil.

E-mail para correspondência: naassi@gmail.com

leilane_go@hotmail.com, marcielbecker@hotmail.com, flaviobcaldeira@gmail.com,

marlonribeiro86@gmail.com, fhfurlan@gmail.com, moleta@gmail.com, carolpescador@yahoo.com.br

RESUMO.- Casos de anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensiva em Mato Grosso e Rondônia são acompanhados desde 2008. Os animais acometidos apresentam fraqueza, mucosas pálidas ou ictericas, urina enegrecida, depressão e anorexia. Esse quadro muitas vezes evolui para morte, principalmente quando os animais são movimentados. Durante esse período aproximadamente 429 bovinos morreram em diferentes surtos e em alguns casos a mortalidade chegou a 50%. Foi realizada investigação para as principais causas infecciosas, bem como para as possíveis causas tóxicas relatadas como etiologia de anemia hemolítica em bovinos. Após exames histopatológicos, colorações especiais, exames hematológicos, bioquímicos e moleculares essas possíveis causas foram excluídas. Não se observou nas propriedades acometidas, nenhuma das plantas já descritas no Brasil como causadora de anemia hemolítica em animais de interesse pecuário no momento das investigações dos surtos. Apesar da etiologia desses casos ainda não ser conhecida, as evidências epidemiológicas, clínicas e

patológicas da doença sugerem que a mesma seja causada por uma planta tóxica de ação hemolítica, presente nas propriedades acometidas, mas que ainda não foi confirmada experimentalmente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: hemoglobinúria, planta hemolítica, intoxicação.

INTRODUÇÃO

Anemia hemolítica é a destruição prematura de hemácias sem o aumento da taxa de reposição (Zachary & McGavin 2013) e é classificada em função do mecanismo de hemólise, localização (intravascular/extravascular), fisiopatologia (imunes/não imunes) e dependendo da velocidade de instauração (agudas/crônicas) (Piqueras et al. 2016). Se caracteriza clinicamente por dispnéia, intolerância ao exercício, palidez das mucosas, aumento da frequência cardíaca, hemoglobinemia, icterícia, hemoglobinúria, febre, e depressão (Lopes et al. 2007). Dentre as causas de anemia hemolítica em bovinos destacam-se as doenças infecciosas, como leptospirose, babesiose, tripanossomíase, anaplasmoses e hemoglobinúria bacilar (Riet-Correa et al. 2001, Schild et al. 2008, Cadioli et al. 2012, Silva et al. 2013, Silva et al. 2015), as doenças de causas tóxicas, como a intoxicação por cobre (Neto et al. 2014) e por plantas tóxicas. *Brachiaria radicans* "tanner-grass", forrageira utilizada para ruminantes e presente em quase todo o território nacional tem sido relatada como causadora de quadros de anemia hemolítica, nos Estados de São Paulo e Santa Catarina (Gava et al. 2010, Tokarnia et al. 2012) e neste último, foi relatado um surto de intoxicação por *Allium cepa* em búfalos com quadro de anemia hemolítica (Borelli et al. 2009). Além destas, há relatos de intoxicação por *Ditaxis desertorum* com importância limitada ao Estado da Bahia (Tokarnia et al. 1997, Tokarnia et al. 2012) e *Indigofera suffruticosa*, popularmente conhecida como "anil", que causa intoxicações em bovinos na região nordeste do país (Figueiredo et al. 2012). Foram relatadas intoxicações, de bovinos por *Brassica napus L. rape* nos Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha e Irlanda, de bovinos e ovinos por *Brassica oleracea var. acephala* nos Estados Unidos, Grã-Bretanha e de bovinos por *Allium canadense* e *Allium schoenoprasum* nos Estados Unidos (Burrows & Tyrl 2013). Casos de intoxicação por *Acer rubrum* (Maple vermelho) foram descritos nos Estados Unidos em alpacas (DeWitt et al. 2004), equinos (Alward et al. 2006) e zebras (Weber & Miller, 1997).

Uma enfermidade de caráter hemolítico é frequentemente observada em bovinos de criação extensiva, desde o ano de 2008 nos Estados de Mato Grosso e Rondônia. Nenhuma das causas conhecidas como hemolíticas foram identificadas e evidências indicam como causa da doença uma planta tóxica ainda não identificada. Diante disso, o objetivo deste estudo é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos da doença hemolítica que acomete bovinos em surtos acompanhados pela equipe do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) e Laboratório de Patologia Animal (LAPAN) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá e Sinop.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2008 a 2016, nove surtos de doença hemolítica em bovinos foram acompanhados pelas equipes do LPV-UFMT e do LAPAN-UFMT, oito no Estado de Mato Grosso e um em Rondônia. As propriedades em que ocorreram os surtos foram enumeradas em ordem crescente de acordo com a sequência cronológica (Surto 1 à 9), assim como os animais examinados (Bovino 1 à 18). Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos junto aos proprietários e/ou médicos veterinários que atenderam as propriedades e em visitas realizadas pelas equipes durante os surtos 1, 3, 4, 7 e 9. Adicionalmente, em 2016, as propriedades foram contatadas novamente com o objetivo de avaliar os surtos e averiguar a recorrência da doença. Destas, cinco propriedades (1, 3, 4, 5, 9) foram revisitadas.

Dos nove surtos acompanhados, 15 animais foram submetidos à necropsia. Alterações macroscópicas foram anotadas e fragmentos de tecidos foram coletados, fixados em formol a 10%, e processados pelas técnicas histológicas rotineiras (Prophet et al. 1992), coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscopia óptica. Adicionalmente, foram realizadas as seguintes técnicas de colorações especiais em todos os casos: Ácido Rubeânico para detecção de Cobre em lâminas histológicas de fígado e rim; Warthin-Starry para detecção de espiroquetas de *Leptospira* sp. em lâminas de rim e Perls para marcação de hemossiderina em lâminas de fígado e baço (Prophet et al. 1992).

Na tabela 1 são descritos os exames complementares realizados. Testes de hemogramas foram realizados pelo método da contagem automática de células, com a utilização do aparelho VET ABC-TM Micros 60, com cartão de leitura de hematócrito para bovinos, além da análise de esfregaço sanguíneo para análise morfológica celular e leucometria diferencial. Esfregaços de sangue total foram processados pela técnica do micro hematócrito (Batista et al. 2008), corados com Panótico®, e analisados por microscopia direta para pesquisa de *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. Exames séricos de

ureia, creatinina e dosagem enzimática foram realizados utilizando kits da Bioclin® e procedeu-se de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de urina foram analisadas pelo método de urinálise para observação de caracteres físicos macroscópicos, pesquisa semi-quantitativa e sedimentoscopia microscópica quantitativa, e por avaliações através de fita reagente (Hemagen®). A diferenciação entre mioglobínúria e hemoglobínúria foi realizada na urina pela técnica qualitativa do Sulfato de Amônio. Foram adicionados 2,8g de Sulfato de amônio em 5 ml de urina, com posterior centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e 5 minutos em repouso, com a passagem de uma fita reagente (Hemagen®) no filtrado (Lopes 2007).

DNA foi extraído a partir de amostras de 250 µl de sangue pertencentes a 3 bovinos de 3 surtos, usando o método padrão fenol - clorofórmio e precipitação com etanol (Sambrook & Russell 2001) e também a partir de amostras de rim, fígado e baço dos mesmos bovinos, fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina, de acordo com a técnica descrita por Shi et al. (2004). O DNA obtido foi analisado em eletroforese com gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo (Sambrook et al. 1989). A presença de *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* sp. e *Leptospira* spp. nas amostras do DNA extraído foram testadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Na detecção de algum agente da família Anaplasma foi utilizado o primer GE2'F2' e HE3 de acordo com protocolo descrito por Melo et al. (2016). Para o gênero Babesia foi utilizado o gene 18S de acordo com Almeida et al. (2012). Para *Trypanosoma* spp. o protocolo utilizado foi de acordo com Cortez et al. (2009), utilizando o kit GFXtmPCR DNA. Para *Leptospira* spp. foram utilizados os primers LipL32-45F e LipL32-286R desenhados por Stoddard et al. (2009) que tem o gene LipL32 como alvo específico para leptospiros patogênicas.

RESULTADOS

Epidemiologia e sinais clínicos

No Estado de Mato Grosso as propriedades acometidas estão situadas no município de Juína (Surto 1 e 8), Porto dos Gaúchos (Surto 3 e 4), Nova Ubitatã (Surto 5), Matupá (Surto 6), Feliz Natal (Surto 7), e Terra Nova do Norte (Surto 9). No Estado de Rondônia a propriedade acometida situa-se no município de Nova Mamoré (Surto 2). Todas as propriedades se localizam nas regiões do bioma Amazônico e de transição Cerrado-Amazônia e mantinham sistema de criação extensiva de bovinos nelore, com predomínio de cria e recria.

Nos Surtos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 a doença ocorreu somente um piquete da propriedade, nos Surtos 4 e 8, bovinos de dois piquetes foram acometidos e no Surto 9 foram em três piquetes. O tamanho dos piquetes variou de 50 a 750 hectares. Em todas as propriedades as pastagens dos piquetes onde ocorreram os surtos eram formadas e compostas por *Brachiaria* spp., com graus variados de degradação, ou sem degradação, com moderada à intensa quantidade de plantas daninhas (figura 1A) nas propriedades dos Surtos 5, 6 e 9 eram realizados consórcio lavoura/pecuária. Esta vegetação invasora era composta por plantas comuns as regiões de mata de transição Cerrado-Amazônia e de Mata Amazônica, com especial destaque a planta *Pleonotomamieloides*, observada em todas as propriedades e com sinais de consumo pelos bovinos, mesmo quando havia boa disponibilidade de pastagem. Em nenhuma propriedade foram observadas plantas já descritas como hemolíticas como *Brachiaria radicans*, *Allium cepa*, *Ditaxis desertorum* e *Indigofera suffruticosa* (Tokarnia et al. 1997, Borelli et al. 2009, Gava et al. 2010, Figueiredo et al. 2012).

Os bovinos dos Surtos 3, 4, e 6, comprados e recém introduzidos no rebanho, e os bovinos dos demais surtos, nativos, manifestavam sinais clínicos com 15 a 20 dias da chegada na propriedade ou da mudança dos piquetes, respectivamente. Iniciavam-se os sinais clínicos da doença e eram agravados após a movimentação dos animais e a evolução até a morte se dava de 1 a 5 dias. Aproximadamente 429 bovinos morreram nestes surtos. A mortalidade variou de 0,26 a 50%, a morbidade foi de 0,57 a 67,11% e a letalidade apresentou variação de 22 a 100%. Os surtos da doença ocorreram nos meses de outubro a junho, com maior ocorrência no mês de outubro. Informações epidemiológicas detalhadas a respeito dos surtos estão dispostas na Tabela 2.

Proprietários e veterinários de propriedades acometidas relatam que outros casos de mortalidade com sintomatologia semelhante ocorreram em diversas ocasiões em propriedades vizinhas ou próximas, mas não foram notificados.

Em todos os surtos os sinais clínicos eram semelhantes e caracterizavam-se inicialmente por palidez de mucosas (16/18 bovinos) e icterícia evidente em mucosas oral e ocular, por vezes de glândula mamária e tetos (11/18), havia fraqueza acentuada (15/18), fadiga e picos de febre (8/18) e com a evolução da doença havia quadros de depressão e tremores musculares acentuados (14/18), anorexia (8/18) e urina de coloração vermelha escura em todos bovinos avaliados. Frequentemente havia

manifestações de agressividade (8/18), além de decúbito(Figura 1B).A evolução da doença incluía uma fase agônica final, onde a morte era de caráter agudo.

Tratamentosuporte foi realizado nos bovinos dos Surtos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9, porém, sem sucesso na recuperação.Os bovinos foram trocados de piquetes quando iniciaram as mortes em todos os surtos. Nessa movimentação houve a morte de alguns animais em quadro mais grave e posteriormente a recuperação dos demais ocorreuem poucos dias, apesar de ainda ocorrerem mortes nos Surtos 2, 4, 6 e 8, por um período de até 15 dias. Posteriormente, outros animais foram introduzidos nos piquetes, até 4 meses após os surtos. Nos Surtos 1, 7 e 9, a introdução de novos animais foi realizado após roçagem das pastagens, no Surto 2, após queima das mesmas e no Surto 4, nenhum manejo foi realizado na pastagem. Em todos os casos de reintrodução de animais, nenhuma manifestação clínica foi observada. A recorrência da doença não foi relatada em nenhum caso, com exceção da propriedade do Surto 4em que relatos de funcionários indicam que um ano após o surto, alguns animais manifestaram sinais clínicos e morte semelhante aos casos de anemia hemolítica. Entretanto essa informação só foi obtida muito tempo após os casos.Nas propriedades dosSurtos 3, 5, 6 e 8, as pastagens foram substituídas por lavoura no ano subsequente, não havendo mais a criação de bovinos nestas áreas.

Avaliação anatomopatológica

Quinze bovinosforam submetidos à necropsia com mínimo de um e máximo de quatro animais por surto. No exame macroscópico de cinco dos quinze bovinos notou-se baixo escore corporal. O sangue de quatro destes apresentava coloração vermelho amarronzado com perda da viscosidade e baixa coagulação. As mucosas, ocular, oral e genital, apresentavam palidez acentuada (3/15 casos) e por vezes com moderada icterícia(6/15), também observada na pele do úbere(3/15). Havia ainda leve a moderada icterícia do tecido subcutâneo e camada serosa de vísceras abdominais e torácicas(6/15). No fígado se observou aumento de volume(4/15), consistência friável e coloração escura(4/15), por vezes amarelada(6/15) e com evidencição do padrão lobular(5/15). A superfície de corte mostrou-se intensamente amarela com áreas avermelhadas (6/15). A vesícula biliar estava repleta e com moderado edema de parede(8/15). Os rins apresentavam aumento de volume(3/15) e coloração marrom escura a enegrecida (9/15)(Figura 1C), apresentando ainda tumefação moderada(4/15), por vezes com áreas de depressão da superfície capsular(2/15).A bexiga continha urina de cor vermelho escuro(12/15)(Figura 1D), e o baço estava aumentado até duas vezes o seu tamanho (4/15).

Histologicamente, as lesões no fígado eram caracterizadas por necrose hepatocelularparacentral (13/15 casos), e ocasionalmente centrolobular (9/15)(Figura 1E).Circundando as áreas de necrose haviam hepatócitos tumefeitos e vacuolizados (8/15), além de infiltrado linfoplasmocitário discreto e multifocal (2/15).Pericolangitelinfoplasmocitária leve e multifocal (7/15) foi observada associada à discreta quantidade de macrófagos espumosos (4/15). Colestase canalicular moderada e multifocal foi observada em 4 casos. Nos rins as lesões foram de nefrose hemoglobínica caracterizada por degeneração (7/15) e necrose moderada de túbulos uriníferos (11/15)com células tubulares com o núcleo picnótico, citoplasma tumefeito e vacuolizado (6/15), por vezes eosinofílico e frequentemente contendo gotículas hialinas (4/15).Notou-se ainda o, material hialino na luz de túbulos (12/15)(Figura 1F), além de áreas focais de calcificação no interstício (1/15) e infiltradolinfoplasmocitário moderado intersticial (6/15). Por fim, no baço havia grande quantidade de substancia castanho claro, caracterizada por hemossiderinadispersa em grande quantidade pelo parênquima, além de discreta quantidade de macrófagos espumosos (7/15),

Nas técnicas de coloração especial do Ácido Rubeânico e Warthin-Starry todos os 15 casos testados apresentaram resultados negativos para marcação por traços de cobre em cortes histológicos de fígado e rim, como também para a presença de espiroquetas de *Leptospira* spp.em cortes histológicos de rim, respectivamente. Na análise qualitativa por método histoquímico com o Azul da Prússia (Reação de *Perls*) em fragmentos histológicos de fígado e baço todos os 15 casos testados apresentaram marcação fortemente positiva para a presença de hemossiderina.

Exames complementares

Na análise do Eritrogramados bovinos avaliados dos Surtos 4, 7 e 9 a quantidade de eritrócitos, e as porcentagens de hemoglobina e hematócritoapresentaram valores muito abaixo do padrão de normalidade para a espécie (Weiss & Wardrop 2011) demonstrando quadro clínico de anemia. O VCM (Volume Corpuscular Médio), o CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média) e as plaquetas apresentaram valores dentro da normalidade. Os valores dos leucócitos e neutrófilos segmentadosapresentaram valores acima da normalidade. A técnica qualitativa do Sulfato de Amônio

apresentou resultado positivo para a presença de hemoglobina nas quatro amostras de urina do Surto 4 evidenciando hemoglobinúria. Avaliações da urina de dez bovinos dos Surtos 3, 4, 7 e 9, através de fita reagente (Hemagen ®) revelaram pH ácido e presença de glicose e leucócitos em quantidade leve. Na urinálise dos bovinos dos Surtos 4, 7 e 9 a coloração da urina apresentou-se mais escurecida em todas as amostras avaliadas, com aspecto predominantemente turvo. O pH ácido foi notado somente em uma das amostras de urina avaliadas. Na pesquisa semi-quantitativa a presença de proteínas e sangue na urina foi encontrada em quantidades significativas nas amostras analisadas. Na sedimentoscopia microscópica quantitativa a quantidade de eritrócitos apresentou valores acima da normalidade.

Na análise de enzimas hepáticas, observou-se que Gama glutamiltransferase (GGT), Creatinofosfoquinase (CK), Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA), como também a Bilirrubina total apresentaram valores muito acima da normalidade. Essas enzimas são de grande uso na rotina clínica, em particular GGT na avaliação de colestase, CK na avaliação de danos hepáticos e Bilirrubina total usada na avaliação de danos hepáticos e com maior elevação em crises hemolíticas (Kaneko 2014). Albumina e Desidrogenase láctica (LDH) apresentaram valores abaixo da normalidade. Com relação aos valores de Uréia e Creatinina houve divergências, notando-se aumento em determinados casos e diminuição em outros.

Na pesquisa por hematozoários como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. e de *Trypanosoma* spp. realizados em 14 bovinos dos 9 Surtos o resultado foi negativo. Nas técnicas de PCR realizadas para detecção de *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. em amostras do DNA extraído de órgãos de três bovinos correspondentes aos surtos 2, 4 e 5 não houve a detecção destes agentes. Nas técnicas de PCR realizadas para detecção de *Leptospira* spp. em três bovinos dos surtos 3 e 9 o resultado foi negativo.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de anemia hemolítica intravascular nos bovinos dos surtos relatados foi realizado por avaliação clínica e patológica dos animais acometidos e confirmada pelos exames hematológicos. As causas de anemia hemolítica em bovinos já relatadas no Brasil foram investigadas e descartadas. Desta forma acredita-se que a doença seja causada por uma planta hemolítica ainda não identificada.

A infecção por *Leptospira* spp. foi descartada devido aos resultados negativos na técnica de PCR e na coloração especial para detecção de espiroquetas no rim. Além disso, os históricos dos casos não informaram alterações reprodutivas frequentes nessa doença (Oliveira et al. 2003, Sandow & Ramirez 2005). Quanto à hematozoários, a infecção por *Babesia* spp. e *Anaplasma Marginale* foi excluída, pois, além dos casos analisados não apresentarem lesões patológicas compatíveis com essas infecções (Smith 2006), a pesquisa destes hemocitozoários por esfregaços de sangue apresentou resultados negativos nas amostras analisadas. Adicionalmente o exame de PCR de órgãos de animais acometidos foi negativo à presença destes agentes. Tripanossomíase foi testada e descartada pelos testes de microhematócrito e técnicas de PCR. Nos casos estudados não foram observadas alterações no leucograma compatíveis com tal infecção e ainda não foram observados sinais neurológicos, lesões em meninges (Batista et al. 2008, Batista et al. 2011) ou distúrbios reprodutivos (Silva et al. 2004, Cadioli et al. 2012, Silva et al. 2013) frequentemente relatadas nessa enfermidade. A suspeita de Hemoglobinúria bacilar foi descartada pela ausência de lesões características dessa doença no fígado (Schilder et al. 2008), além da ausência de fasciola ou outros parasitas no órgão (Cullen & Stalker 2016). Hematúria enzoótica não foi cogitada devido à ausência de alterações vesicais de origem neoplásica (Riet-Correa et al. 2001, Gabriel et al. 2009, Galvão et al. 2012, Furlan et al. 2014) e baixa porcentagem ou ausência de infestação das pastagens por *Pteridium arachnoideum* e *P. caudatum* nas propriedades onde os surtos ocorreram (Furlan et al. 2014). A intoxicação por cobre foi descartada através da coloração do Ácido Rúbeico que não evidenciou o mineral em tecidos dos animais acometidos.

Das plantas tóxicas causadoras de anemia hemolítica descritas no Brasil nenhuma delas foi observada nas propriedades em que ocorreram os surtos. Dentre elas estão, *Allium cepa*, que não é cultivada nas regiões onde ocorreram os surtos, *Brachiaria radicans*, que ocorre somente em áreas alagadas no Pantanal Matogrossense e *Ditaxis desertorum* e *Indigofera suffruticosa* frequentes na região nordeste do país, e não relatadas nos Estados de Mato Grosso e Rondônia. As manifestações clínicas e patológicas da doença aqui estudada são bastante semelhantes às relatadas nas intoxicações pelas plantas supracitadas e são caracterizadas por quadro de anemia hemolítica aguda, com palidez ou icterícia de mucosas, urina de coloração vermelho escura, assim como fígado e rins que também apresentam coloração vermelho escuro, que correspondem à hemoglobinúria, à necrose de hepatócitos das regiões centrolobular e paracentral e nefrose hemoglobinúrica com proteinúria, respectivamente (Tokarnia et al. 1997, Borelli et al. 2009, Gava et al. 2010, Salvador 2010, Figueiredo et al. 2012). Nos surtos

acompanhados, aproximadamente 429 bovinos morreram, de um total de aproximadamente 2.529 animais das propriedades acompanhadas. A morbidade e mortalidade variaram consideravelmente, com índices de 0,57 a 67,11% e 0,26 a 50%, respectivamente. Já a letalidade apresentou variação de 22 a 100%. Consideráveis perdas econômicas são observadas nesses casos, não somente atribuídas às mortes destes bovinos, mas também aos gastos com contratação de médicos veterinários e compra de medicamentos, que na maioria das vezes não são utilizados em função da rápida progressão da doença.

Quanto aos animais afetados, não foi observado predileção por idade ou sexo, contudo, a maior parte dos bovinos afetados foram fêmeas adultas, isso devido ao fato das propriedades acometidas possuírem sistema de cria e recria. Adicionalmente, as nove propriedades mantinham sistema de criação extensiva de bovinos da raça nelore. Em todos os piquetes onde ocorreu a doença, as pastagens eram recém-formadas e compostas por *Brachiaria* spp. com graus variados de degradação e com leve a intensa invasão por plantas comuns às regiões de Mata Amazônica e transição Cerrado-Amazônia. Esses piquetes frequentemente faziam divisa com áreas mata, ou ainda apresentavam sistema de integração lavoura-pecuária o que favoreceu o contato dos bovinos com plantas tóxicas. Além disso, os casos de anemia hemolítica ocorreram nos meses de outubro a junho, com maior prevalência no mês de outubro, época que corresponde ao início das chuvas nessas regiões e coincide com a brotação de forragens e plantas daninhas. Durante inspeção de pastagens realizadas em visitas às propriedades um fato comum a todos os casos era a presença da planta *Pleonotomamelioides*, conhecido popularmente por “cipó-quatro-quinas. Tal planta, no momento dos surtos estava em fase de brotação e apresentava sinais de consumo pelos bovinos, mesmo em locais onde havia boa disponibilidade de pastagem, demonstrando boa palatabilidade da planta e talvez maior toxicidade na fase de brotação. Tais indícios levam a crer que esta planta pode estar associada aos casos de intoxicação e estudos adicionais serão realizados na tentativa de reprodução experimental da doença através da administração da planta. Outro fato comum nos surtos é que eles ocorreram em poucos piquetes, sendo que em seis casos, ocorreram somente em um piquete na propriedade. Além disso, os sinais clínicos iniciavam-se poucos dias após a troca de pasto ou introdução de novos bovinos nas áreas. Tal fato pode estar relacionado ao primeiro contato dos animais com a planta, ou com período de estresse e fome vivido por esses animais em momento anterior. Tal característica é vista em algumas intoxicações, como no caso de *Brachiaria radicans* (Gava et al. 2010).

Após as primeiras mortes, em todos os casos os bovinos foram trocados de pasto. Com essa movimentação, houve a precipitação de algumas mortes e os animais com quadro clínico mais grave morreram por um período de até 15 dias. Entretanto, os demais animais se recuperaram em poucos dias. Essa recuperação após remoção dos animais da área afetada ou mesmo com a continuidade da ingestão da planta é frequentemente relatada em casos de intoxicação por plantas hemolíticas, como *Ditaxis desertorum*, *Indigofera suffruticosa* e *Brachiaria radicans* (Tokarnia et al. 1997, Barbosa Neto et al. 2001, Gava et al. 2010, Figueiredo et al. 2012) e talvez se deva a modificações da flora ruminal que se adapta para alterar a estrutura química do princípio ativo, ainda não conhecido nessas plantas. Tal recuperação corre também em bovinos intoxicados por plantas do gênero *Brassica*, que contém S-metilcisteína sulfóxido (SMCO), metabólito que no rúmen por ação de bactérias, sofre metabolização em dimetildissulfeto, que causa hemólise (Cheeke 1998). A recuperação da anemia em casos de intoxicação por *Brassica* ocorre, provavelmente, devido a uma adaptação parcial dos microorganismos do rumem produzindo menos dimetildissulfeto.

Em cinco propriedades, novos animais foram introduzidos nos piquetes onde ocorreram os surtos, em um período de até 4 meses. Essa introdução foi realizada após manejo de roçagem em três casos, após queima da pastagem em um e sem nenhum manejo em outro caso. Manifestação clínica da doença não foi observada em todos os casos. Acredita-se que a roçagem e a queima das pastagens tenham diminuído a infestação da planta tóxica nas áreas, e ainda, que quando esses animais foram introduzidos nos piquetes, o período mais tóxico da planta tenha passado não havendo manifestação clínica da doença mesmo naquele local em que nenhum manejo foi realizado. Nas propriedades, que não foram substituídas por lavoura e ainda mantinham bovinos nas áreas acometidas, não foi relatada recorrência da doença, com exceção de uma única propriedade em que houve relatos de casos semelhantes, porém esses casos não foram acompanhados. É possível que a ocorrência de surtos seja limitada a variações pluviométricas, com maior desenvolvimento da planta ou mesmo maior toxicidade da mesma em consequência de maior quantidade de chuvas naquelas áreas em períodos específicos. Nesse período nove surtos foram acompanhados, entretanto há relatos de casos semelhantes em várias regiões do Estado de Mato Grosso. Acredita-se que muitos outros casos ocorram, porém com a recuperação dos animais após um período, as equipes de diagnóstico não são solicitadas e os casos não são contabilizados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que anemia hemolítica diagnosticada em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rondônia tem considerável impacto nas localidades onde ocorrem, com índices de morbidade e mortalidade razoáveis e alto índice de letalidade. Até o momento a doença tem sua etiologia desconhecida; entretanto evidências epidemiológicas, clínicas e patológicas sugerem que a mesma seja causada por uma planta tóxica de ação hemolítica ainda não identificada e presente nas pastagens das propriedades acometidas. Estudos adicionais com experimentação animal devem ser realizados na tentativa de identificar tal planta.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Almeida A.P., Marcili A., Leite R.C., Nieri-Bastos F.A., Domingues L.N., Martins J.R., & Labruna M.B. 2012. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). Tick sand tick-borne diseases, 3(4), 203-206.
- Alward A., Corriher C.A., Barton M.H., Sellon D.C., Blikslager A.T., & Jones S.L. 2006. Red maple (*Acer rubrum*) leaf toxicosis in horses: a retrospective study of 32 cases. J. Vet. Med., 20(5), 1197-1201.
- Barbosa Neto J.D., Oliveira C.M.C., Peixoto P.V., Barbosa I.B.P., Ávila S.C. & Tokarnia C.H. 2001. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 21(1):18-22.
- Batista J.S., Olinda R.G., Rodrigues C.M.F., Silva T.M.F., Vale R.G., Viana G.A., Oliveira A.F. & Oliveira M.F. 2008. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. Pesq. Vet. Bras. 28 (1): 63-69.
- Batista J.S., Rodrigues C.M.F., García H.A., Bezerra F.S.B., Olinda R.G., Teixeira M.M.G. & Soto-Blanco B. 2011. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. Veterinary Research, 42:63.
- Borelli V., Lucio J., Furlan F.H., Hoepers P.G., Roveda J.F., Traverso S.D. & Gava A. 2009. Fatal onion (*Allium cepa*) toxicosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Vet. Diagn. Invest. 21(3):402-405.
- Burrows G.E. & Tyrrel R.J. 2013. Toxic Plants of North America. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. Chapter Sixteen, pg 290. Chapter Forty-six, pg. 754-755.
- Cadioli A.F., Barnabé P.A., Machado R.Z., Teixeira M.C.A., André M.R., Sampaio P.H., Junior O.L.F., Galdes M.M.T., Marques L.C. 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 21(2):118-124, abr.-jun.
- Cheeke P.R. 1998. Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. Danville, Illinois, p.302-306.
- Cortez A.P., Rodrigues A.C., Garcia H.A., Neves L., Batista J.S., Bengaly Z., Paiva F. & Teixeira M.M. 2009. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. Molecular and Cellular Probes, 23(1), 44-51.
- Cullen J.M., Stalker M.J. 2016. In: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 3, Cap. 2, pg. 258, 6ª ed St Louis-Missouri.
- DeWitt S.F., Bedenice D., Mazan M.R. 2004. Hemolysis and Heinz body formation associated with ingestion of red maple leaves in two alpacas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 225:539, 578-583.
- Figueiredo A.P., Medeiros R.M., Dantas F.P., Leite A.L., Figuera R.A. & Riet-Correa F. 2012. Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos. Pesq. Vet. Bras, 32(2):126-130.
- Furlan F.H., Costa F.L., Silvio C.S., Torres J., Kerber F.L., Damasceno E.S., Salino A. & Riet-Correa F. 2014. Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematuria enzoótica bovina. Pesq. Vet. Bras. 34(8):753-759.
- Gabriel A.L., Kommers G.D., Masuda E.K., Figuera R.A., Piazer J.V., Barros C.S. & Rosa F.B. 2009. Aspectos clínicos-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 29(7):515-525.
- Galvão A., Brito M.D.F., Aragão A.P., Yamasaki E.M., Peixoto P.V. & Tokarnia C.H. 2012. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. Pesq. Vet. Bras. 32(9):887-902.
- Gava A., Simone de Deus M.R., Branco J.V., Mondadori A.J. & Barth A. 2010. Intoxicação espontânea e experimental de *Brachiaria radicans* ("taner grass") em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 30(3):255-259.

- Kaneko J.J. 2014. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 3th ed. pp. 351-378. Elsevier Academic Press.
- Lopes S.T., Biondo A.W., Santos A.P. 2007. Manual de Patologia Clínica Veterinária - 3. ed. - Santa Maria: UFSM/Dep. Clin. Peq. An. 107 p. pg 69.
- Melo A.L.T., Witter R., Martins T.F., Pacheco T.A., Alves A.S., Chitarra C.S., Dutra V., Nakazato L., Pacheco R.C., Labruna M.B. & Aguiar D.M. 2016. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Med. Vet. Entomol*, 30(1), 112-116.
- Neto H.M.A., Freitas M.D., Sanches I.X.B. 2014. Considerações sobre intoxicação crônica por cobre em ovinos. *Rer. Col. de Ciên. An. Vol.7*, n.1.
- Oliveira M.A.A., Caballero O.L., Vago A.R., Harskeerl R.A., Romanha A.J., Pena S.D.J., Simpson A.J.G. & Koury M.C. 2003. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *J. of Med. Micro.* 52(2): 127-135.
- Piqueras M.B., Perianes V.C., Arnao M.M., & Fierrez E.S. 2016. Actualización en anemias hemolíticas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(20), 1148-1158.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., and Sobin L.H. 1992. Laboratory methods in Histotechnology. *Arm. F. Inst. of Pathol.*, Washington DC, 279p.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Lemos R.A. 2001. Doenças de ruminantes e equinos - São Paulo: Livraria Varela, 2ºed. Vol. I, 426 p.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Lemos R.A. 2001. Doenças de ruminantes e equinos - São Paulo: Livraria Varela, 2ºed. Vol. II, 574 p.
- Salvador I.S., Medeiros R.M.T., Pessoa C.R.M., Dantas A.F.M., Sucupira Jr G. & Riet-Correa F. 2010. Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):953-957.
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, v. 1-3.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandow K. & Ramírez W. 2005. Leptospirosis. *REDVET*. VI 6(6):1-6. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605.html>>. Acessado em 02/2016.
- Weiss D.J. & Wardrop K.J. 2011. Schalm's veterinary hematology. Cap. 107. Normal Hematology of Cattle. John Wiley & Sons. 6th ed. 1232 pg.
- Schild A.L., Ruas J.L., Farias N.A., Grecco F.B., & Soares M.P. 2008. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. *Ciência Rural*, 38(9):2646-2649.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A. & Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), 941-953.
- Silva J.B., Cordeiro M.D., Manier B.S.M.L., Valim J.R.A., Bomjardim H.A., Fonseca A.H., Barbosa J.D. 2015. Detecção sorológica de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de corte das regiões Norte e Centro Oeste do Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, maio/jun, 36(3):1431-1436.
- Silva R.A.M.S., Pellegrin A.O., Ramirez E.S.S.L.L. & Dávila A.M.R. 2004. Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia. *Doc. 75, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS*. 30p.
- Silva T.M.F., Olinda R.G., Rodrigues C.M.F., Câmara A.C.L., Lopes F.C., Coelho W.A.C., Ribeiro M.F.B., Freitas C.I.A., Teixeira M.M.G. & Batista J.S. 2013. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. *Vet. Res.* 44:1.
- Smith B. P. 2006. Medicina Interna de Grandes Animais, 3ª ed. Manole, Barueri, SP.
- Stoddard R.A., Gee J.E., Wilkins P.P., McCaustland K., Hoffmaster A.R. 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the Lip32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:247-255.
- Tokarnia C.H., Brito F.M., Barbosa J.D., Peixoto P.V., Döbereiner J. 2012. Plantas tóxicas do Brasil. 2.ed. Helianthus, Rio de Janeiro. 586p.
- Tokarnia C.H., Chagas B.R., Chagas A.D. & Silva H.K. 1997. Anemia hemolítica causada por *Ditaxis desertorum* (Euphorbiaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 17(3/4):112-116.
- Weber M., Miller R.E. 1997. Presumptive red maple (*Acer rubrum*) toxicosis in Grevy's zebra (*Equus grevyi*). *J. Zoo Wild Med.* 28:105-108.

Legenda das figuras

Fig 1. Anemia hemolítica tóxica em bovinos. A. piquete onde ocorreu um dos surtos, evidenciando pastagem recém formada por *Brachiaria* spp., com pouca disponibilidade de matéria verde e intensa invasão de plantas daninhas. B. Bovino em decúbito esternal com fraqueza muscular e relutância a levantar-se. C. Rim de coloração enegrecida. D. Bexiga urinária contendo urina de coloração vermelho escuro “cor de coca-cola”. E. Corte histológico de fígado com necrose paracentral de hepatócitos, HE, Obj 20X. F. Corte histológico de rim com nefrose hemoglobinúrica, HE, Obj 20X.

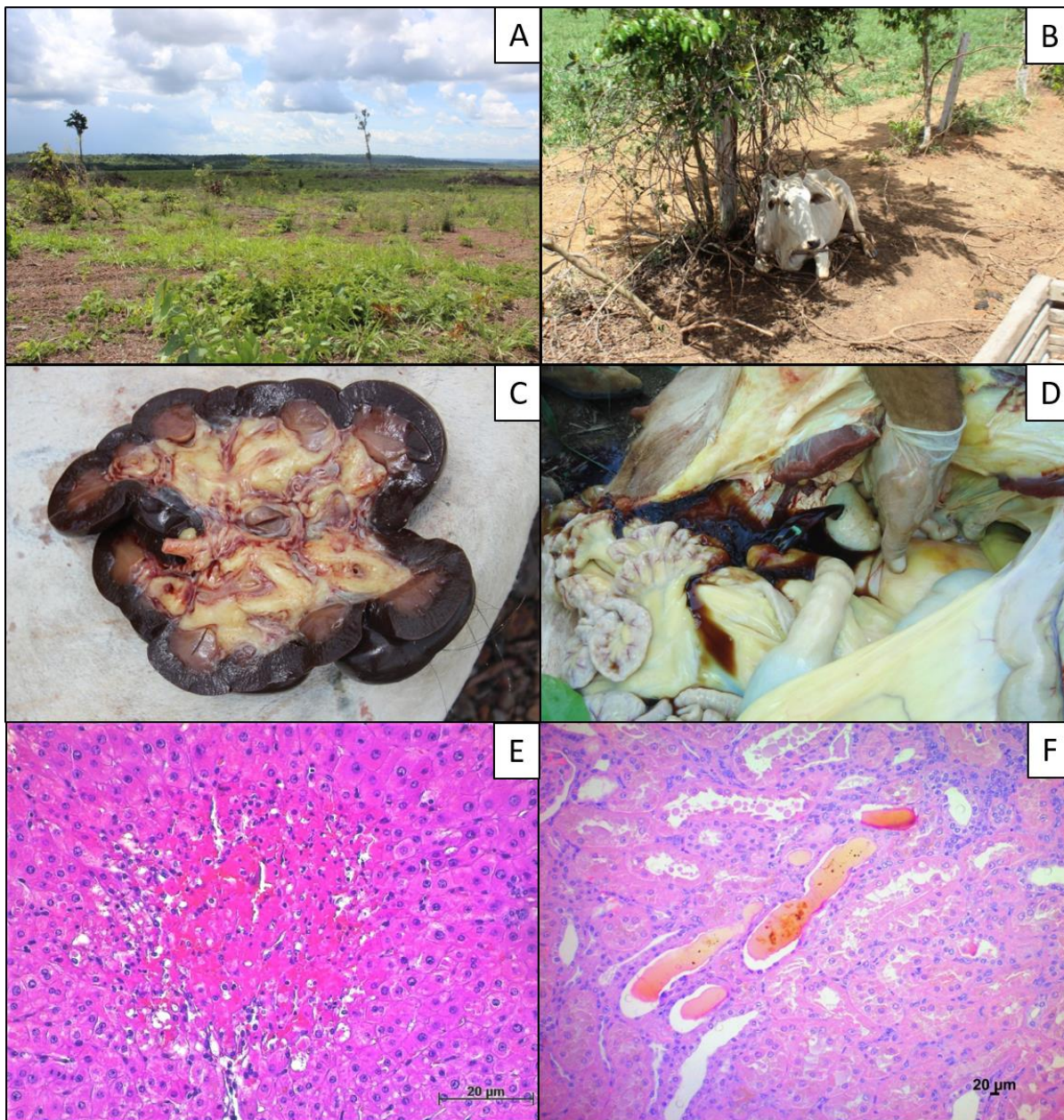


Tabela 1. Exames realizadas nos bovinos diagnosticados com Anemia Hemolítica no LPV/LAPAN da UFMT de 2008 a 2016.

Surtos	Bovinos	Hemograma	Esfregaço sanguíneo	Enzimas hepáticas	Urinálise	Técnica do sulfato de Amônia	PCR Anaplasma	PCR Babesia	PCR Trypanossoma	PCR Leptospira	Necropsia
1	B1	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
	B2	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
2	B3	NR	R	NR	NR	NR	R	R	R	NR	R
3	B4	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	R
4	B5	R	R	R	R	R	NR	NR	NR	NR	R
	B6	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	R
	B7	R	R	R	R	R	NR	NR	NR	NR	R
	B8	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	R
5	B9	NR	NR	NR	NR	NR	R	R	R	NR	R
	B10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
6	B11	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
7	B12	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
	B13	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	B14	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	B15	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	B16	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	R
9	B17	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R
	B18	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R

B1 a B18: bovino 1 ao 18. PCR: Reação em cadeia de polimerase. R: Realizado. NR: Não realizado



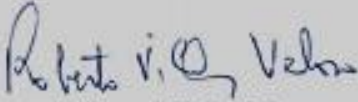
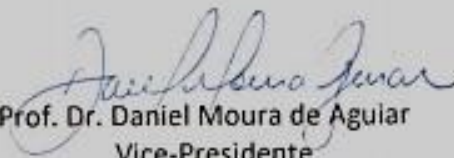
Tabela2. Dados epidemiológicos dos bovinos diagnosticados com Anemia Hemolítica no LPV/LAPAN da UFMT de 2008 a 2016.

Surto	Localização	Rebanho total	Bovinos no lote	Bovinos mortos	Mortalidade (%)	Nº necropsias	Idade (M/A)	Sexo M/F	Pastagem	Invasão plantas daninhas	Cons. Lavoura/pecuária	Manejo do piquete após o surto	Mês/Ano primeiro diagnóstico
1	Juína-MT	600	140	12	8,57	2	3 anos	0/2	<i>Brachiariaspp.</i>	++	Não	Roçagem	Jun/2008
2	Nova Mamoré-RO	500	300	25	5,00	1	Adulto	0/1	<i>Brachiariaspp.</i>	+++	Não	Queima	Out/2012
3	Porto dos Gaúchos	1.400	700	40	5,71	1	Adulto	0/1	<i>Brachiariaspp.</i>	+++	Não	Lavoura	Jun/2012
4	Porto dos Gaúchos-MT	10.000	149	22	14,76	4	6 M á 8 A	0/3	<i>Brachiariahíbrida(Convert™HD 364</i>	++	Sim	Nenhum	Out/2013
5	Nova Ubiratã-MT	10.334	450	3	0,66	2	5 A	0/2	<i>Brachiariaziziensis</i>	+	Sim	Lavoura	Out/2013
6	Matupá-MT	1.200	500	250	50,00	1	2 A	1/0	<i>Brachiariaspp.</i>	++	Sim	Lavoura	Dez/2013
7	Feliz Natal-MT	1.500	100	4	4,00	1	Adulto	0/4	<i>Brachiariaspp.</i>	+++	Não	Roçagem	Fev/2014
8	Juína-MT	5.000	100	50	50,00	1	Adulto	0/4	<i>Brachiariaspp.</i>	++	Não	Lavoura	Mar/2014
9	Terra Nova do Norte-MT	3.700	90	23	25,55	2	Adulto	0/2	<i>Brachiaribrizanta cv.piatã</i>	+++	Sim	Roçagem	Abr/2016

M/F: macho/fêmea; M/A: mês/ano; N°: número; (+): leve; (++): moderada; (+++): intensa; Cons.: consórcio. Fev: fevereiro; Mar: março; Abr: abril; Jun: junho; Out: outubro; Dez: dezembro. A.fogo: Ateamento de fogo.P. lavoura: plantação de lavoura.

Quadro3. Resultados de Hemograma, Enzimas hepáticas e urinálise de bovinos diagnosticados com Anemia hemolítica pelo LPV/LAPAN da UFMT de 2008 a 2016.											
ERITROGRAMA											
	Bov.5	Bov.6	Bov.7	Bov.8	Bov.12	Bov.13	Bov.14	Bov.15	Bov.17	Bov.18	PN*
He *(µL)	1.40	2.23	1.46	NR	1.64	1.98	2.09	NR	1.86	1.89	5-10
Hb (g/dL)	2	5.20	2	NR	4.1	3.9	4.6	NR	3.2	3.4	8-15
Ht (%)	6	14	6	NR	11.36	12.80	12.50	NR	9.18	9.51	24-46
VCM (fL)	42.86	62.78	42.92	NR	69	65	60	NR	49	50	40-60
CHGM (%)	33.33	37.14	14.29	NR	36.02	30.04	36.09	NR	34.08	36	30-36
Plaquetas (µL)	394	442	396.00	NR	772	346	258	NR	609	347	200-80
LEUCOGRAMA											
Leucócitos totais (µL)	9,400	26	9.300	NR	20.430	13.710	15.760	NR	14.370	13.030	4.000-12.000
Neutrófilos segmentados(µL)	7.708	8.840	6.500	NR	10.827	7.951	8.195	NR	9.340	10.424	2.500-7.500
ENZIMAS HEPÁTICAS											
G.G.T (UI/L)	61	122	482	87	NR	NR	NR	NR	280	290	6.1-17.4
C.K. (UI/L)	1219	1311	3448	1297	NR	NR	NR	NR	NR	NR	4.8-12.1
A.L.T.(UI/L)	120	141	199	112	NR	NR	NR	NR	NR	NR	11-40
Fosfatase alcalina (UI/L)	132	124	240	127	NR	NR	NR	NR	713.20	287.40	0-488
Albumina (g/dl)	2.10	1.70	2.30	1.50	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3.3-3.55
Bilirrubina total (mg/dl)	5.20	6.60	6.20	6.30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0.01-0.5
Uréia (mg/dl)	56	54	109	112	NR	NR	NR	NR	65	70	48.2-64.2
Creatinina (mg/dl)	2	1.40	4.00	1.70	NR	NR	NR	NR	1.9	2.1	1-2
LDH (UI/L)	898	340	NR	560	NR	NR	NR	NR	NR	NR	692-1445
URINÁLISE											
Cor	Castanho	Castanho	Castanho	Vermelho	NR	Amarelo pálido	NR	Castanho	NR	NR	Amarelo-palha á âmbar claro
Aspecto	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	NR	Límpido	NR	Turvo	NR	NR	Transparente á límpido
Densidade	1018	1030	1026	1015	NR	1002	NR	1016	NR	NR	1015-1045
pH	9	9	9	8	NR	8.5	NR	5.5	NR	NR	7.5-8.5
Proteínas	+	Ausente	+	+++	NR	+	NR	+++	NR	NR	Ausente
Sangue	+++	Ausente	+++	++++	NR	++	NR	++++	NR	NR	Ausente
Hemácias (campo 40x)	20	Ausente	3	30	NR	10	NR	20	NR	NR	1 a 2/campo
Flora bacteriana	++	++	++	+	NR	++	NR	++++	NR	NR	Discreta
<p>He: hemácias. Ht: hematócrito. Hb: hemoglobina VCM: volume corpuscular médio CHGM: concentração de hemoglobina globular média. B.5: bovino 5, B.6: bovino6, B.7: bovino 7, B.4: bovino 4, B.8: bovino 8, B.12: bovino 12. B.13: bovino 13 B.14: bovino 14 B.15: bovino 15 B.17: bovino 17. B.18: bovino 18. (+): traços, (++)leve, (+++): moderado, (++++): intenso. *valores de referência. N : não realizado. IFD: Imunofluorescência direta (imprint rim). hemog: positivo hemoglobina. PN*: padrão de normalidade segundo Weiss (2011), Lopes et al. (2007).</p>											

Anexo 4. Certificado de aprovação no Comitê de Ética no uso animal

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
<hr/>		
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>Certificamos que o Protocolo Nº 23108.709966/2015-06, sobre “Estudo etiológico, epidemiológico, clínico e lesional da doença hemolítica tóxica que acomete bovinos nos estados de Mato Grosso e Rondônia”, sob a responsabilidade de Profª Drª NADIA ALINE BOBBI ANTONIASSI/Leilane Aparecida da Silva Rondelli & Col., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 30/10/2015.</p>		
<h3>CERTIFICATE</h3>		
<p>We certify that the protocol Nº 23108.709966/2015-06, entitled “Etiologic study, epidemiological, clinical and lesional of hemolytic disease toxic that affects cattle in the states of Mato Grosso and Rondônia”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on October 30, 2015.</p>		
<p>Cuiabá-MT, 30 de outubro de 2015.</p>		
		
<p>Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso Presidente</p>	<p>Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar Vice-Presidente</p>	
<hr/>		
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367 Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil	Telefone: (65) 3615 8829 Fax: (65) 3615 8254 E-mail: cepe@ufmt.br	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAÃO D. C. et al. **Aspectos clínicos e patológicos da infecção natural em bovinos leiteiros por *Trypanosoma vivax* em Minas Gerais, Brasil.** *Ciência Animal Brasileira*, 1, 666-671, 2009.
- AGUIAR D. M. et al. **Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(2), 102-104, 2006.
- ALMEIDA A. P. et al. **Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae).** *Ticks and tick-borne diseases*, 3(4), 203-206, 2012.
- ALWARD A. et al. **Red maple (*Acer rubrum*) leaf toxicosis in horses: a retrospective study of 32 cases.** *Journal of veterinary internal medicine*, 20(5), 1197-1201, 2006.
- ALZUGARAY D. & ALZUGARAY K. **Enciclopédia de plantas brasileiras.** Editora Três, São Paulo. p.54, 1988.
- ANDRADE S.O., PEREGRINO C.J.B. & AGUIAR A.A. **Estudos sobre *Brachiaria* sp. (Tanner Grass). I. Efeito nocivo para bovinos.** *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 38(3):135-150, 1971.
- ANTONELLI C. A., WANDERLEY S. W. C., ORTOLANI L. E. **Intoxicação cúprica acumulativa em ovinos: Revisão de literatura.** *Revisão de literatura PUBVET*, Londrina, V. 4, N. 34, Ed. 139, Art. 938, 2010.
- ANTONIASSI N. A. B. et al. **Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul.** *Ciencia rural*. Santa Maria. Vol. 39, n. 3.p. 933-936, 2009.
- ASLANI M. R, MOHRI M., MOVASSAGHI A. R. **Heinz body anaemia associated with onion (*Allium cepa*) toxicosis in a flock of sheep.** *Comparative Clinical Pathology*. 14:118–120, 2005.
- AZEVEDO M. A. S. et al. **Lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica: padronização de técnica de colheita, obtenção de amostras e avaliação citopatológica.** *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 01-08, 2015.
- BARBOSA NETO J.D. et al. **Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(1):18-22, 2001.
- BARROS S. L et al.. **Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(6), 513-517, 2005
- BATISTA J.S. et al. **Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats.** *Veterinary Research*, 42:63, 2011.
- BATISTA J. S. et al. **Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infection in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission.** *Parasitol Res.* 110(1): 73-80, 2012.

BATISTA J. S. et al. **Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system.** Veterinary parasitology, 143(2), 174-181, 2007.

BATISTA J.S. et al.. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 28 (1): 63-69, 2008.

BILHASSI T.B. **Estudo do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da Raça Canchim naturalmente infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 113 p.2016.

BLOCK E. **The organosulfur chemistry of the genus *Allium*—implications for the organic chemistry of sulfur.** Angewandte Chemie International Edition in English, 31(9), 1135-1178, 1992.

BOCK R. E. et al. **Babesiosis of cathe.** Parasitology. V. 129, n. 2, p.247-269, 2004.

BORELLI V. et al..**Fatal onion (*Allium cepa*) toxicosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*).**Journal of veterinary diagnostic investigation . 21(3):402-405, 2009.

BOWMAN D. **D.Georgi's Parasitology for Veterinarians.** 9th ed. St. Louis, Missouri, USA, Saunders Elsevier, 451,2009.

BURROWS G.E. & TYRL R.J. **Toxic Plants of North America.**Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. Chapter Sixteen, pg 290.Chapter Forty-six, Pg. 754-755, 2013.

CADIOLI A.F. et al.**First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil .**Rev. Bras.Parasitol. Vet., Jaboticabal, 21(2):118-124, 2012.

CALLOW L. L., HOYTE H. M. D.**Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia spp.*, and the cattle tick *Boophilus microplus*.**Australian Veterinary Journal, v.37, p.381-390,1961.

CAMPO M. S.**Animal model of papilomavirus pathogenesis,** Virus Research, v. 89, p.249–26. 2002.

CANEVER M. F. et al. **First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR.** The Korean journal of parasitology, 52(5), 507,2014.

CARELLI G. et al..**Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR.** Veterinary microbiology, Amsterdam, 124(1), 107-114, 2007.

CARTER G. R., CHENGAPPA M. M. &ROBERTS A.W. **Essentials of Veterinary Microbiology.** 5a ed. Williams & Wilkins, cap. 14. p. 134-141, 1995.

CARVALHO A. U. et al. **Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 60(3), 769-771, 2008.

CASTRO J. R. D. et al. **Sorovares de *Leptospira spp.* predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44(2), 217-222, 2011.

CHEEKE P. R.. **Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants.**2nd ed. Danville, Illinois, p.302-306,1998.

CIANCIOLO R. E., MOHR F. C. **Urinary System.** In: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals.Vol. 2, Cap. 4, pg. 436-437, 6° ed St Louis-Missouri, 2016.

COETZER J. A. W., THOMSON G. R., TUSTIN R. C. **Infectious diseases of Livestock**. Vol. 1. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 729, 1994.

CORRÊA, F. N. **Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro (Tese de Doutorado), 2011.

CORRIHER, C. A. et al. **Equine red maple leaf toxicosis**. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 21(1), 74-80. 1999.

CORTEZ A. P. et al. **Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America—characterization, relationships and diagnostic implications**. Molecular and cellular probes, 23(1), 44-51, 2009.

COSTA-JUNIOR L. M. et al. **Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites**. Veterinary Parasitology, v. 139, n. 1-3, p. 231-236, 2006.

COSTA V. M. D. M. et al. **Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 22(2), 207-213, 2013.

COTRAN R. S. & COLLINS T. **Red cells and bleeding disorders**. In: Robbins Pathologic basis of disease. Ed. 6. Saunders, cap 14, pg. 604, 1999.

CUGLOVICI D. A. et al. **Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil**. Veterinary parasitology, 169(3), 320-326, 2010.

CULLEN J. M. & MACLACHEN N. J. **Liver, biliary system and exocrine pancreas**. In: M.D. MCGAVIN, W.W. CARLTON & J.F. ZACHARY. Thompson's Special Veterinary Parasitology, (3rd edition). USA: Mosby, Inc, 2001.

CULLEN J.M., STALKER M.J. In: **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Vol. 3, Cap. 2, pg. 258, 6° ed St Louis-Missouri, 2016.

DA SILVA A.S. et al. **Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil**. Parasitol Research, 108(1): 23-30, 2011.

DA SILVA J. B. **Detecção sorológica de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de corte das regiões Norte e Centro Oeste do Brasil**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 3, p. 1431-1436, 2015.

DA SILVA J. B. et al. **Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil**. Veterinary parasitology, 197(3), 678-681, 2013.

DÁVILA A. M. R. & SILVA R. A. M. S. **Animal trypanosomiasis in South America: Current status, partnership, and information technology**. Annals of the New York Academy of Sciences. 916: 199-212, 2000.

DAWRA R. K. & SHARMA O. P. **Enzootic bovine haematuria - past, present and future**. Veterinary Bulletin, 71, R1-R27. 2001.

DEWITT S.F., BEDENICE D., MAZAN M.R. **Hemolysis and Heinz body formation associated with ingestion of red maple leaves in two alpacas**. Journal of the American Veterinary Medical Association . 225:539, 578-583, 2004.

DÍAZ G.T. et al. **Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão**. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Maringá, v. 9, n. 5, p. 279-286, 2015.

- DO VALLE C. B., JANK L., & RESENDE R. M. S. **O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil.** Revista Ceres, 56(4), 460-472, 2009.
- ESTIMA-SILVA P. et al. **Sudden death in cattle in southern Brazil: epidemiology and diagnosis.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 36(1), 19-23, 2016.
- FARIAS N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina.** Ed. Guaíba Agropecuária, cap. 3, 4, p. 29-33, 34-36, 1995.
- FENWICK G. R., HANLEY A. B. **The genus *Allium*—part 3.** Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 23;1–73, 1985.
- FIGHERA R. A. et al. **Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa* (Liliaceae) em gatos. [Experimental poisoning by onion, *Allium cepa* (Liliaceae) in cats].** Pesquisa Veterinária Brasileira, 22 (2): 79-84, 2002.
- FIGUEIREDO A. D. O. et al. **Prevalence and risk factors for bovine leptospirosis in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 29(5), 375-381, 2009.
- FIGUEIREDO A.P. et al. **Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 32(2):126-130, 2012.
- FRY M. M. & MCGAVIN M. D. **Bone marrow, blood cells, and lymphatic system.** In: Zachary J. F. & McGavin M. D. Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier, Ed. 6, chap. 13, p. 716-732, 2013.
- FURLAN F.H. et al. **Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematúria enzoótica bovina.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 34(8):753-759, 2014.
- GABRIEL A.L. et al. **Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 29(7):515-525, 2009.
- GALIZA G. J. et al. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino.** Pesquisa Veterinária Brasileira 30(3), 267-276, 2010.
- GALVÃO A. et al. **Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 32(9):887-902, 2012.
- GARCÍA H. et al. **Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection.** Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 100(4), 297-305, 2006.
- GAVA A. et al. **Intoxicação espontânea e experimental de *Brachiaria radicans* (“*taner grass*”) em bovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira 30(3):255-259, 2010.
- GIGLIOTI R. **Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos.** Tese (Doutorado em genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP, 2013.
- GIRARDIA. M. et al. **Anaplasmose congênita em bezerra (*Bos indicus*) da raça nelore-relato de caso.** Nucleus Animalium, 4(1), 2012.
- GOMES C. A. V. D. C. **Fasciolose em bovinos de engorda.** Doctoral dissertation, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2012.
- GOMES M.B. **Revisão de *Pleonotoma Miers* (Bignoniaceae, Bignoniaceae).** Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 2006.
- GOMES M.J.P. **Gênero *Clostridium* spp.** FAVET-UFRGS. 67 pg, 2013.

- HARVEY J. W. & RACKEAR D. **Experimental onion-induced hemolytic anemia in dogs.** *Veterinary Pathology*, 22:387–392, 1985.
- HAUER P. J., YEARY T. J. & ROSENBUSCH R. F. **Cloning and molecular characterization of the beta toxin (phospholipase C) gene of *Clostridium haemolyticum*.** *Anaerobe* 10: 243–254, 2004.
- HOMEM V. S. F. et al. **Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(2), 173-180, 2001.
<https://www.mysciencework.com/publication/show/4367e3ead46f91f390e6f1c16c74b0dd>. Acesso em 27 jan. 2017.
- HUSSEIN H. A. et al. **Bacillary hemoglobinuria in dairy cows: clinical, hematological, biochemical, and pathological alterations.** *Comparative Clinical Pathology*, 22(6), 1137-1143, 2013.
- HUTCHISON T. W. S. **Onions as a cause of Heinz body anaemia and death in cattle.** *The Canadian Veterinary Journal*, 18:358–360, 1977.
- JESSE F. F. A. et al. **Suspected bacillary haemoglobinuria in a calf: A case report.** *Journal Advanced Veterinary Animal Science* 4(9), 458-461, 2016.
- JONSSON N. N., BOCK R. E., JORGENSEN W. K. **Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia.** *Veterinary Parasitology*, v. 155, p. 1-9, 2008.
- JULIANO R. S. et al. **Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO.** *Ciência Rural*, 857-862, 2000.
- JUNIOR G. et al. **Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(2), 105-109, 2008.
- KANEKO J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** Elsevier Academic Press, 3th ed. pp. 351-378, 2014.
- KOCAN K. M. et al. **The natural history of *Anaplasma marginale*.** *Veterinary parasitology*, Amsterdam, 167 (2), 95-107, 2010.
- LAGE A. P., & LEITE M. H. **Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraíba, Brazil.** *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 74(3), 185-190, 2007.
- LANGONI H. et al. **Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo.** *Arquivos do Instituto Biológico*, 67(1), 37-41, 2000.
- LAZARUS A. E. & RAJAMANI S. **Poisoning due to onion spoilage in cattle.** *The Indian Veterinary Journal*, 45(10):877–880, 1968.
- LEVETT P. N. **Leptospirosis.** *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326, 2001.
- LEVETT P. N., & HAAKE D. A. ***Leptospira* species (leptospirosis).** *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 7th edn.* Churchill-Livingstone, Philadelphia, 3059-4005, 2010.
- LEVINE N. D. **Taxonomy of the piroplasms.** *Transactions of the American Microscopical Society*, v.90, p.2-33, 1971.
- LILENBAUM W., & SOUZA G. N. **Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil.** *Research in Veterinary Science*, 75(3), 249-251. 2003.

- LOBATO F. C., SALVARANI F. M., & ASSIS R. A. **Clostridioses dos pequenos ruminantes Clostridiosis of small ruminants**. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias RPCV, 102(561-562), 23-34, 2007.
- LOPES S.T., BIONDO A.W., SANTOS A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária - 3. ed.** - Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica Pequenos Animais, 107 p. pg 69,2007.
- LORENZI H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**.3.ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 608 p. 2000.
- LOSOS G. J. & IKEDE B. O. **Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodediense* and *T. congolense***.Veterinary Pathology, 9:267-274,1972.
- LOUREIRO A. P.et al.**Detecção de *Leptospira sp.* em muco cervico-vaginal de vacas sugere importância do portador vaginal na epidemiologia da leptospirose bovina**. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia, 14(2), 93-93,2016.
- LOUREIRO A. P. F. R. **Babesiose cerebral em bezerros oriundos de transferência de embrião**.2010. Disponível em:<<https://www.mysciencework.com/publication/show/4367e3ead46f91f390e6f1c16c74b0dd>>. Acesso em 05 jan, 2017.
- MACHADO R. Z. et al. **An enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle**. Veterinary Parasitology, v. 71, p. 17-26, 1997.
- MAHONEY D. F. & MIRRE G. B. ***Babesia argentina*: the infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*)**. Research in Veterinary Science, v.16, p.112-114, 1974.
- MELO A. L. T. et al. **A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil**. Medical and veterinary entomology, 30(1), 112-116, 2016.
- NETO H.M.A., FREITAS M.D., SANCHES I.X.B. **Considerações sobre intoxicação crônica por cobre em ovinos**. Revista Colombiana de Ciência Animal, Vol.7, n.1,2014.
- NOTOMI M. K. et al. **Intoxicação por ingestão por cebola (*Allium cepa L.*), com formação de corpúsculo de Heinz, em um cão com insuficiência renal crônica [Onion (*Allium cepa L.*) toxicosis, with Heinz bodies formation in a dog with chronic renal failure-case report]**. Clínica Veterinária, 53: 32-36, 2004.
- NUGEM R.C. **Doenças relacionadas ao Saneamento ambiental inadequado (DRSAI) em Porto Alegre-RS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Enfermagem, Programa de pós-graduação em saúde coletiva. Porto Alegre/BR/RS. 117 f,2015.
- OAKS J. L. et al. **Apparent *Clostridium haemolyticum* /*Clostridium novyi* infection and exotoxemia in two horses**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9: 324-325, 1997.
- OKASI S. C. et al. **Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

- OLIVEIRA A.A. F. et al. **Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, pernambuco State, Brazil.** The Onderstepoort journal of veterinary research, 68(4), 275, 2001.
- OLIVEIRA M. A. A. et al. **Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*.** Journal of Medical Microbiology, 52(2): 127-135, 2003.
- OLIVEIRA M. C. S. et al. **Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick.** Veterinary Parasitology, 155:281, 2008.
- OSAKI S. C. et al. **Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 11(2), 77-83, 2002.
- OSTROWSKA E. et al. **Consumption of brown onions (*Allium cepa* var. *cavlier* and var. *destiny*) moderately modulates blood lipids, haematological and hemostatic variables in healthy pigs.** British Journal of Nutrition, 91, 211-218, 2004.
- PAIXÃO A. P. et al. ***Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes.** Arquivos do Instituto Biológico, 83, 01-12, 2016.
- PEARSON W. et al. **Association of maximum voluntary dietary intake of freeze-dried garlic with Heinz body anemia in horses.** American journal of veterinary research, 66:457-465, 2005.
- PEIXOTO P. V. et al. **Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 23(2), 65-81, 2003.
- PELLEGRIN A. O. et al. **Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense.** Embrapa Pantanal, 1999.
- PETROVSKI K. **Vade Mecum of Cattle Conditions.** In: Cockcroft P. D. Bovine Medicine, Edited by Peter D. Cockcroft. Third Edition. Wiley & Sons. Cap. 16, p. 572, 2015.
- PINTO C. A. **Hematúria enzoótica bovina: contribuição para o seu estudo etiopatogénico.** Universidade técnica de Lisboa. Tese de doutoramento em ciências veterinárias. 229 p, 2010.
- PIPER E. K. et al. **Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus*.** International Journal for Parasitology, 40, p.431-441, 2010.
- PIQUERAS M. B. et al. **Actualización en anemias hemolíticas.** Medicina-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 12(20), 1148-1158, 2016.
- PLUMLEE K.H. **Clinical veterinary toxicology.** Elsevier Health Sciences. 504 pg. 2003.
- PROPHET E. B. et al. **Laboratory methods in Histotechnology.** Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 279p, 1992.
- RADOSTITIS O. M. **Doenças causadas por Protozoários.** In: RADOSTITIS O. M., GAY C. C., BLOOD D. C., HINCHCLIFF K. W. 2002. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 25, p. 1156-1202, 2002b.
- RADOSTITIS O. M. **Doenças causadas por Riquetsias.** In: RADOSTITIS O. M., GAY C. C., BLOOD D. C., HINCHCLIFF K. W. 2002. Clínica veterinária: um tratado

de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 23, p. 1132-1146, 2002a.

RADOSTITIS O. M. et al. **Diseases associated with protozoa**. 10th Edn. In: Veterinary Medicine: A textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders Elsevier, p. 1483-1540, 2008.

RAE H. A. **Onion toxicosis in a herd of beef cows**. The Canadian Veterinary Journal 40:55–57, 1999.

RIET-CORREA B. et al. **Intoxicação por *Brachiaria* spp. em ruminantes no Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(3), 183-192, 2011.

RIET-CORREA F. BEZERRA C.W.C., MEDEIROS R.M.T. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. INCT. Sociedade Vicente Palotti Editora, 2011.

RIET-CORREA F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos** - São Paulo: Livraria. Varela, 2ªed. Vol. I, 426 p. 2001.

RIET-CORREA F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos** - São Paulo: Livraria. Varela, 2ªed. Vol. II, 574 p. 2001.

RODRIGUES A. et al. **Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos**. Ciência Rural, v.35, n.1, p.121-125, 2005.

RODRIGUES A. et al. **Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 25(4), 239-249, 2005.

ROLIM M. B. Q. **Determinação de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no Estado de Pernambuco**. Revista de Medicina Veterinária, 7(1), 24-30, 2013.

ROSENFELD G., REICHMANN C. E. & ANDRADE S. O. **Anemia hemolítica em bovinos alimentados com *Brachiaria* sp. (*Tanner Grass*)**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 38(4):267-273, 1971.

SAHINDURAN S. **Protozoan Diseases in Farm Ruminants**. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. Ed. Intech., p.473-500, 2012.

SALVADOR I.S. et al. **Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (Leg. *Papilionoideae*) em bovinos**. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(11):953-957, 2010.

SALVADOR I. S. **Experimental poisoning of guinea pig (*Cavia porcellus*) with *Indigofera suffruticosa***. Toxicon.57, 927–931, 2011.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SAMBROOK J., RUSSEL D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, v. 1-3, 2001.

SANDOW K. & RAMÍREZ W. **Leptospirosis**. Revista Electrónica de Veterinária REDVET. VI 6(6):1-6. 2005. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605.html>>. Acessado em fev/2016.

SANTANA C. H. **Estudo genômico do nível de infecção por *Babesia bovis* em bovinos da raça Angus**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp, Campus de Jaboticabal. 52p. 2016.

SANTAROSA B. P. et al. **Infecção neurológica por *Babesia bovis* em bovino neonato—relato de caso**. Veterinária e Zootecnia, 20(3), 447-452, 2013.

- SCHILD A.L. et al. **Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato.** *Ciência Rural*, 38(9):2646-2649, 2008.
- SCHILD A.L. **Hemoglobinúria Bacilar.**In: Riet-Correa F., Schild A. L., Lemos R.A. A. & Borges J.R.J. (ed). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3 ed. Santa Maria, RS, Pallotti, V.1, Cap. 3, p. 305-308, 65, 2007.
- SELIM H. M. et al. **Rumen bacteria are involved in the onset of onion induced hemolytic anemia in sheep.** *Journal of veterinary medical Science*,61: 369-374, 1999.
- SHI Y. et al.**Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1.** *Cell*, 119(7), 941-953, 2004.
- SHINOZUKA, Y. et al. **Bacillary hemoglobinuria in Japanese black cattle in Hiroshima, Japan: a case study.** *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(2), 255-258, 2011.
- SILVA D. M. et al. **Aumento da frequência de bovinos sororreagentes para *Leptospira interrogans* sorovar *hebdomadis* na região de Uberlândia, estado de Minas Gerais, Brasil.** *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 14(2), 92-92, 2016.
- SILVA F. J. D. **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão.** Dissertação mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 2011.
- SILVA J. B. et al. **Detecção sorológica de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de corte das regiões Norte e Centro Oeste do Brasil.** *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 36(3):1431-1436, 2015.
- SILVA R.A.M.S. et al. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia.** Doc. 75, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS. 30p. 2004.
- SILVA R.A.M. S. et al.**Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 91(5):561-562, 1996.
- SILVA R. A. M. S. et al.***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle.** EmbrapaPantanal. Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil: 141 p. 2002.
- SILVA R. C., LANGONI H. **Epidemiologia da raiva em quirópteros e os avanços em biologia molecular.** *Veterinária e Zootecnia*.18(1):19-37, 2011.
- SILVA T. M. F. et al. **Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes.** *Veterinary Research*.44:1, 2013.
- SMITH B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**, 3^o ed. Manole, Barueri, SP,2006.
- SOARES C. O. et al. **Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2), 75-79, 2000.
- SOARES FILHO C. V. **Brachiaria – espécies e variedades recomendadas para diferentes condições.** Campinas: CATI, 26 p. (CATI. Boletim Técnico, 226), 1996.
- SOUTO G. M. D. A. M. et al.**Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina.** *Ciência Rural*, 36(5), 2006.
- SOUZA F. D. A. et al. **Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(9), 1057-1061, 2013.

- SOUZA J. C. P. et al. **Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 20(3), 97-101, 2000.
- STODDARD R.A. et al. **Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the Lip32 gene** Diagnostic microbiology and infectious disease.64:247-255, 2009.
- SUTTLEN.F. **The Mineral Nutrition of Livestock.** CABI International, 4th ed. London: 579p.2010.
- TAYLOR M. A., COOP, R. L., WALL R. L. **Parasitas de Bovinos.** In: 3º ed. Parasitologia Veterinária, Guanabara Koogan, cap. 2, p.42-127, 2010.
- THOMSON J.A., MICKEL J.T., MEHLTRETER K. **Taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium: Dennstaedtiaceae*) of Laurasin affinity in Central and North America.** Botanical Journal of the Linnean Society. V. 157, p. 1-17, 2008.
- TOKARNIA C. H. et al. **Anemia hemolítica causada por *Ditaxis desertorum* (*Euphorbiaceae*) em bovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 17(3/4):112-116, 1997.
- TOKARNIA C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil.** 2.ed. Helianthus, Rio de Janeiro. 586p. 2012.
- TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J. & PEIXOTO P.V. **Plantas de ação radiomimética,** p.178-187. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 310p, 2000.
- TOKARNIA C. H., DÖBEREINER J., & PEIXOTO P. V. **Poisonous plants affecting livestock in Brazil.** Toxicon, 40(12), 1635-1660, 2002.
- VALLE E., DEL MORO E., PADALINO B. **Garlic effects in the horse: a clinical report.** Ippologia 17;35–39, 2006.
- VALLI V. E. O., KIUPEL M., BIENZLE D. **Hematopoietic System.** In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animal, vol.1, cap. 2, p. 112-116, 2016.
- VAN DER KOLK J. H. **Onion poisoning in a herd of dairy cattle.** Veterinary Record, 147;517–518, 2000.
- VIDOTTO O. & MARANA E. R. M. **Diagnóstico em anaplasmosse bovina.** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.2, p. 361-368, 2001.
- VILLALOBOS J. S. et al. **Clinica y patologia de la intoxicación com Napper (*Tannergrass*).** Ciencias Veterinarias, Costa Rica, 3 (2/3):163-169, 1981.
- WARWICK S. L. **Brassica.** In: Flora of North America North of Mexico, vol. 7. Flora of North America Editorial Committee, ed. Oxford University Press, New York, pp. 419-424, 2010.
- WEBER M. & MILLER R.E. **Presumptive red maple (*Acer rubrum*) toxicosis in Grevy's zebra (*Equus Grevyi*).** Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 28:105-108, 1997.
- WEISS D.J. & WARDROP K.J. **Schalm's veterinary hematology.** Cap. 107. Normal Hematology of Cattle. John Wiley & Sons.6th ed. 1232 pg, 2011.
- WHIGHT I. G., RIDDLES P. W. **Biotechnology in tick born diseases. Present status, future perspectives.** FAO-Un Biotechnology for Liverstock Production Plenum, New York, p. 325-240, 1989.
- WOO P.T.K. **The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.** Acta Tropica, 27:384-386, 1970.

YAMATO O. et al. **Reduced glutathione accelerates the oxidative damage produced by sodium N-propylthiosulfate, one of the causative agent of onion induced hemolytic anemia in dogs.** Biochim Biophys Acta, 1427: 175-182, 1999.

YAMATO O., MAEDE Y. **Susceptibility to onion-induced hemolysis in dogs with hereditary high erythrocyte reduced glutathione and potassium concentrations.** American journal of veterinary research, 53;134–137,1992.