

CUADRO TREMORGENICO EN BOVINOS PRODUCIDO POR  
HONGOS DE LOS GENEROS PENICILLIUM Y ASPERGILLUS PRODUCTORES DE  
PATULINA AISLADOS DE UN POLVO DE DESHECHO DE  
MOLIENDA DE MALTA. (CASCARA DE CEBADA).

Dr. F. Riet Alvariza <sup>1</sup>  
Dr. J. Rodriguez <sup>2</sup>  
Ing. Agr. J. Le Bars <sup>3</sup>  
Dr. Eugenio Perdomo <sup>1</sup>  
Dra. C. Paullier <sup>1</sup>  
Dr. G. Uriarte <sup>1</sup>  
Ing. Agr. C. Monteiro <sup>4</sup>  
\* Sulamita Collazo <sup>5</sup>  
José Abdala <sup>5</sup>  
Dra. Teresita Alonso <sup>1</sup>

INTRODUCCION

Se han publicado en nuestro país (5), (6) cuadros nerviosos (tremorgénicos) de origen tóxico, en bovinos, producidos por el hongo *Claviceps paspali*, parasitando gramíneas del gén. *Paspalum* (*P. dilatatum* y *P. notatum*) y por Pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*), asociado a hongos.

A continuación se describe un caso de intoxicación en bovinos producido por la ingestación de un polvo de deshecho de molienda de malta (cáscara de cebada), estudiada en un tambo, y diagnosticado por el Dr. Jorge Rodríguez, colega de la Regional de Conaprole de Canelones.

MATERIALES Y METODOS

Historia Clínica

Con el Dr. Jorge Rodríguez se estudia este caso clínico en un tambo ubicado en el paraje "el Gigante" en el departamento de Canelones.

Necropsia

Se sacrificó una vaca que se encontraba en decúbito costal, agonizando, con opis

<sup>1</sup> Méd. Vet. del CIVET M.C. Rubino MGAP Pando-Casilla Correo 6577 - Mdeo. - Uruguay.

<sup>2</sup> Méd. Vet. de la Regional de Conaprole de Canelones.

<sup>3</sup> Ing. Agr. Station de Pharmacologie et Toxicologie, Toulouse. INRA. France.

<sup>4</sup> Ing. Agr. Div. Fitopatología - Sanidad Vegetal - MGAP

<sup>5</sup> Ayudantes Técnico del CIVET Miguel C. Rubino - MGAP

tótonos. Se extrajo sangre para estudio de patología clínica. Se realizó la anátomo e histopatología.

Se extrajo sangre de vacas que presentaban sintomatología, para realizar el funcional hepático, hemograma, determinaciones de calcemia, magnesemia, fosfatemia. Métodos: SGOT - Reitman y Frankel; Gamma GT - Szas; Prot.tot: R. de Biuret Fosfa tasa alcalina; Mét. de Bessen.

#### Estudios Toxicológicos

- a. Reproducciones experimentales en terneros: Se administró a terneros (2) la cáscara de cebada (suplementando con forraje). Se tomaron muestras de sangre y se realizaron las necropsias correspondientes. (estudios anátomo e histopatológicos).
- b. Reproducciones experimentales en lauchas: Se administró la cáscara de cebada a estos animales de laboratorio y se observaron los efectos tóxicos correspondientes.
- c. Aislamientos de hongos del polvo de deshecho de molienda de malta: Se emplearon técnicas para aislamiento de hongos (1), aislándose distintos géneros y especies.
- d. Cultivo de hongos de los gén. Penicillium y Aspergillus en un medio productor de toxina, por el Método de Kirskey y Cole (3).
- e. Siembra de los hongos aislados en otro medio productor de toxina de acuerdo a Hou, Ciegler, Hesseltine (2).
- f. Siembra de los cultivos de hongos de los Gén. Penicillium y Aspergillus en un medio de cultivo productor de patulina, de acuerdo a B. Opacka, L.Escoula (4)
- g. Estudio químico-toxicológico del polvo de deshecho de molienda de malta. Se utilizó el método de Multideteccción de Micotoxinas (7), así como pruebas biológicas con extractos de alimento.

#### RESULTADOS

##### Historia clínica

Categoría de animales: vacas holando en producción. Total: 80 vacas. Morbilidad: 25 vacas afectadas (31%). Mortalidad: 7 vacas (8%).

Manejo del rodeo: Las vacas se encontraban en el tambo pastoreando avena, rastrojo de sorgo y campo natural. Se suplementaban con concentrado a base de polvo de molienda de malta, cáscara de avena y germen de maíz.

##### Sintomatología:

Cuadro de sintomatología con muerte de animales.

Los animales más afectados presentan evidente hiperexcitabilidad, hipersensibilidad, movimientos exagerados e incoordinados de los miembros, con merma importante en la producción de leche. Al hacerlas caminar se destaca un cuadro de ataxia importante, con movimientos incoordinados en el largo y alto de los pasos, así como en la velocidad, con arpeo, en algunos casos de los miembros posteriores; - coceo, temblores musculares, mioclonias. Esta sintomatología se agravaba cuando se azuzaban los animales. Ligero tinte icterico en algunos animales.

Las vacas menos afectadas con cambio frecuente de posición de los miembros posteriores, con movimientos exagerados e incoordinados.

#### Tratamiento

Se realiza tratamiento sintomático a base de sedantes, vitaminas del complejo B suero glucosado.

#### Necropsia

Sacrificio de una vaca que está agonizando. Se observa un cuadro discreto de ictericia generalizado.

Congestión a nivel de abomaso. Hemorragias sub-epicárdicas en aurículas. En el S.N.C. se observa una congestión meníngea, no apreciándose cambios macroscópicos en la masa encefálica.

Histopatología: En el S.N.C. no se observaron lesiones. Hígado con degeneración hidródica vacuolar, focos de necrosis coagulativa, discreta degeneración grasa; acúmulo de pigmento hemático.

Miocardio: tumefacción de las fibras, degeneración grasa, pequeños focos de necrosis con acúmulos de células polimorfonucleares, zonas de hemorragias sub-endocárdicas.

Riñón: focos congestivos donde los túbulos presentan contenido de albúmina. (cilindros).

Pulmón: engrosamiento a nivel de los tabiques interlobulillares.

#### Análisis microbiológico

No se observaron gérmenes patógenos.

#### Patología Clínica:

En la vaca que se autopsió se observa una marcada elevación de las enzimas SGOT y Gamma GT, lo que evidencia un grado de lesión hepática. La elevación de la -SGOT también puede estar involucrando una alteración a nivel de la fibra muscular.

#### Estudios Toxicológicos

Reproducciones experimentales con la cáscara de cebada en terneros:

Terneros	Tiempo de Administ.*	Síntomas nerviosos	Muerte natural(M)
1	36	+++++++	M
2	78	+++++++	M

\* (días)

Se administró a los terneros el polvo de molienda de malta ad libitum, con suplementación de forraje.

Sintomatología: Ataxia, astasia, sialorrea, temblores musculares, sudoración profusa, opistótonos, extensión de los miembros posteriores al agitarlos, luego flexión de los miembros anteriores, posición decúbito. Toda esta sintomatología se ponía más de manifiesto al agitar los animales. Agresividad; atacaba-

a las personas que se le acercaban, incoordinación, miccolonias, respiración agitada; un ternero caminó en pinza doblando las pezuñas hacia atrás, heces blancas, diarrea. Muerte de los animales.

Necropsia: Ternero 1: solamente se observó aumento de líquido cefalo-raquídeo en la cavidad craneana. Histopatología: S.N.C. discreto edema caracterizado -- por un cuadro de esponjosis y gliosis difusa.

Ternero 2: Pulmón ligeramente congestivo. Intestino, ligera congestión. Corazón: sufusiones en epicardio y endocardio. Histopatología: Hígado con tumefacción turbia. Pulmón: neumonía intersticial S.N.C. s/p. Riñón: s/p.

Patología Clínica: Ternero 1. Marcada elevación de la enzima SGOT posiblemente debida a una alteración a nivel de la célula muscular, no excluyéndose la posibilidad de una lesión hepática. Ternero 2. Elevación de las enzimas SGOT y Gamma GT. Lesión hepática.

Análisis Microbiológico: Se aísla *Escherichia coli*.

Reproducción experimental en lauchas con el polvo de deshecho de molienda de malta.

Cáscara de cebada	Nº lauchas	Muertas	Sacrificio	Tiempo adm. (días)	Síntomas nerviosos.
ad libitum	18	15	3	4 - 15	+++++++

Síntomas: ataxia, astasia, temblores musculares, micción frecuente, disnea; al hacerlas caminar se acrecientan los síntomas; estiran los cuatro miembros hacia atrás, depresión y muerte.

Aislamiento de hongos del polvo de deshecho de molienda de malta: Este alimento se encontró contaminado y se aislaron e identificaron los hongos: *Penicillium granulatum*, *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.* y *Aspergillus versicolor*.

Los cultivos de *Penicillium spp.* y de *Aspergillus spp.* sembradas en el medio de producción de toxina, de acuerdo al método de Kirskey y Cole (3), resultaron tóxicos cuando se administraron a pollitos y a lauchas.

Hongo	Nº pollitos	Micelio del hongo	Extracto clorofórmico
<i>Penicillium granulatum</i>	10	5/5	1/5

Murieron los cinco pollitos que comieron el micelio del hongo, secado y molido, mezclado con 125 grs. de ración. Murió un pollito de los cinco que recibieron el extracto clorofórmico. Esto indica que la o las toxinas del hongo permanecieron en mayor porcentaje en el micelio del hongo.

De doce lauchas que recibieron cultivos de *Penicillium* y *Aspergillus*, nueve presentaron ataxia, temblores en el cuerpo, oscilación de la cabeza y tronco hacia un lado y otro, adelgazamiento, deshidratación, debilidad, apareciendo los sínto

mas entre los 4 a los 18 días del comienzo de la administración de los cultivos (al 50% en la ración).

La siembra de estos hongos en otro medio productor de toxina, de acuerdo a C.T. Hou, A.Ciegler y C.W.Hesseltine (2) dieron los siguientes resultados: A los 4 días de la administración de estos cultivos al 50% en la ración se observó:

Cultivos	Efectos tóxicos
Penic. granulatum	ataxia - muerte
Asp. glaucus	ligera ataxia
Asp. clavatus	ataxia - muerte
Asp. versicolor	negativo
Asp. flavus	negativo
Rhizopus	ataxia - temblores
Mucor	muerte

Sembrados los cultivos de Penicillium spp. y Aspergillus spp. en un medio de cultivo para la producción de patulina, de acuerdo a B. Opacka y L.Escoula (4) se observaron los siguientes resultados:

Cultivos	Producción de Patulina
Penic. granulatum	Patulina positivo (++++)
Asp. clavatus	Patulina positivo (++)
Asp. glaucus	negativo
Asp. versicolor	negativo
Asp. flavus	negativo
Penic. roquefortii	negativo

#### Estudio Químico - Toxicológico del polvo de deshecho de molienda de malta:

Un extracto de este alimento (100 grs.) en cloroformo-metanol (70-30 y 95-5,v/v) e inyectando vía i/p a lauchas resultó tóxico, presentando los animales una sintomatología de ataxia, depresión, temblores musculares, oscilaciones del cuerpo hacia un lado y otro y muerte.

Este alimento (cáscara de cebada) resultó negativo a las siguientes micotoxinas: aflatoxinas, patulina, sterigmatocistina, ocratoxina, citrinina, penitrem A, verruculógeno.

#### DISCUSION

Productos metabólicos capaces de producir temblores (metabolitos tremorgénicos) - convulsiones y muerte en animales son producidos por varias especies de Penicillium así como de Aspergillus (Asp. clavatus, Asp. flavus, Asp. fumigatus, Asp. caespitosus). En estudios realizados en terneros por otros autores, Cysewski et al (1975), no fueron detectados cambios significativos en la calcemia, magnesio-

mia, magnesemia, ni en los niveles de colinesterasa eritrocitaria sanguínea en animales intoxicados. Se ha observado degeneración grasa de hígado en algunos animales. No se presentan lesiones a nivel de encéfalo ni de médula espinal. Las alteraciones en los constituyentes plasmáticos son efectos secundarios en la intoxicación. Un efecto directo de la toxina en la célula muscular, aumentando la permeabilidad de la membrana celular no puede ser excluido. Aunque ni el Penitrem A ni otros tremórgenos han sido encontrados como contaminantes naturales en el pienso, el aislamiento de hongos toxogénicos de varios alimentos, sugiere un peligro potencial con estas toxinas. La producción de tremórgenos para las siguientes especies de *Penicillium* fue confirmada por los test de animales; de acuerdo a A. Ciegler & J.I.Pitt (1970) *Penic. granulatum*, *Penic. crustosum*, *Penic. puberulum*, *Penic. cyclopium*, *Penic. palitans*, *Penic. olivino viride*, *Penic. uertensii*.

*Aspergillus clavatus* puede producir micotoxinas tremorgénicas en cebada perlada (A.L.Demain et al 1976). Puede producir Cytochalasin E y dos nuevos tremórgenos: *tryptoquivaline* y *tryppquivalone*. También puede producir otros tremórgenos: *nortryptoquivaline*, *deoxitryptoquivaline*, *deoxinortryptoquivaline*, *nortryptoquivalone*, *deoxinortryptoquivalone*.

Trigo infectado por *Asp. clavatus* fue asociado a problemas nerviosos en bovinos, con parálisis progresiva del tren posterior, salivación (Jacquet, Boutibonnes, Cicile 1963). La mayoría de ratones que comieron trigo contaminado con *Asp. clavatus*, presentaron pérdida de equilibrio, parálisis del tren posterior y muerte. (Jacquet et al 1963). *Penicillium roquefortii* puede producir la toxina -PR, así como agroclavina.

*Asp. flavus* es capaz de producir también tremórgenos (aflatrem, aflavinina) que se pueden encontrar en la masa del micelio como en el escleroto. (B.J.WILSON). La patulina es producida por varias especies de hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssochlamys* (4). Este metabolito antibiótico tóxico y cancerígeno fue aislado por Chain et al (1942) y por Birkinshaw et al (1943) de *Penic. claviforme* y de *Penic. expansum* y *Penic. patulum* (sinón, *Penic. urticae*), respectivamente. Patulina es producida también por *Aspergillus clavatus*, *Penic. granulatum*, *Penic. melinii*, *Penic. equinum*, *Penic. novae zelandiae*, *Penic. divergens*, *Penic. griseofulvum*, *Penic. leucopus*, *Penic. cyclopium*, *Penic. lapidosum*, *Asp. giganteus*, *Asp. terreus*, *Byssochlamys nivea*. (Scott 1974).

No hay una evidencia definida que la patulina haya causado intoxicación en animales bajo condiciones de campo. Sin embargo, especies de *Penicillium*, más tarde identificadas como *Penic. urticae*, aislados de alimentos de malta, asociados con muertes de bovinos en Japón, han mostrado producir este material (Ukai et al 1954, Yamamoto 1954 a). Los granos de malta inoculados con este hongo produjeron signos nerviosos, hemorragia cerebral y muerte en ratones y un toro (Yamamoto 1954 b).

*Penicillium granulatum* aislado de nuestro polvo de desecho de molienda de malta también produjo patulina y resultó tóxico, coincidiendo estas investigaciones con lo anteriormente mencionado.

Malta germinada conteniendo *Asp. clavatus* ha sido asociada con la muerte de ganado en Alemania (Schultz 1968, Schutz et al 1969). En este caso también hay coincidencia similar con nuestras investigaciones donde se observó la presencia de *Asp. clavatus* en la cáscara de la cebada y que cultivado en medios productores de toxina resultó tóxico.

El polvo de molienda de malta de este caso de estudio resultó tóxico administrado a terneros, lauchas. Un extracto de cloroformo-metanol de este alimento resultó tóxico en lauchas. De acuerdo a estos resultados y a lo manifestado por otros autores (Yamamoto 1954 b), en este alimento, bajo la acción de los hongos mencionados se forma un metabolito y/o metabolitos tremorgénicos que son los causantes de la intoxicación. Estos hongos que forman estos metabolitos son capaces de producir patulina en medios de cultivo apropiados para ello.

## CONCLUSION

Se presentó un cuadro tremorgénico en bovinos asociado a la ingestión de un polvo de deshecho de molienda de malta, contaminado con hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Mucor*. Los estudios realizados resaltan la importancia de *Penicillium granulatum* y *Aspergillus clavatus* como hongos productores de patulina, asociado a otros hongos, en la etiología de esta micotoxicosis.

## BIBLIOGRAFIA

1. J. LE BARS - Station de Pharmacologie et Toxicologie de Toulouse. INRA. - France.
2. C.T. HOU, A. CIEGLER, C.W. HESSELTINE. Tremorgenic Toxins from *Penicillia*. *Applied Microbiology*. June 1971, pp 1101 - 1103.
3. J.W. KIRSKEY & R.J. COLE - Screening for producing fungi. *Mycopathologia et Micologia applicata* vol 54, 3 291 -296 (1974)
4. B. OPACKA et L. ESCOULA - Production de la patuline en milieu liquide par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. *Ann. Rech. Vet.* 1977,8 (2) 129 -133.
5. F. RIET ALVARIZA, F. RIET CORREA, E. PERDOMO, M. CORBO, P. McCOSKER (1976) Síndrome nervioso en bovinos causados por el hongo *Claviceps paspali*. *Veterinaria (Uruguay)* 12 (61) 1976.
6. F. RIET ALVARIZA, F. RIET CORREA, M. CARBO, H. MENY, S. SALLUA, P. McCOSKER - (1977) Síndrome nervioso en bovinos producido por la ingestión de Pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*).
7. F. RIET ALVARIZA - Depo. de Toxicología. CIVET M.C. RUBINO MGAP.

VACAS DEL CASO CLINICO

Prot. tot.	VACAS			
	* s/n	1	2	3
gr, %	7.1			
Album gr %	4.1			
Glob. gr %	4.1			
R A/G	0.73			
SGOT U/K	400			
GGT UI/l	120	35	25	50
Post. alc. UI	94			
Ca. mg. %		8.75	7.86	8.04
P mg %		7.39	6.71	6.04
Mg mg %		2.04	2.15	2.17
Microhemat <sub>3</sub>		32		33
Leucoc. mm <sup>33</sup>		10850		11700
Neut. segm %		34		29
Linf. peq. %		51		71
Monoc. %		3		1
Eosinof. %		6		--

(\*) S/N = vaca que agonizaba y se sacrificó.

1,2 y 3 = vacas con sintomatología nerviosa que no se encontraban en decúbito.

No se realizó el análisis de todos los parámetros por inconvenientes surgidos con las muestras.



CUADRO Nº2. Terneros. Reproducción experimental

	TERNERO 1		TERNERO 2
	a los 12 días del comienzo de los síntomas	a los 20 días del comienzo de los síntomas	con sintematología
Prot. tot. gr. %	6.6	5.7	6.8
Albúm gr. %	3.1	2.5	3.8
Glob. gr. %	3.5	3.2	3.0
RA/G	0.89	0.78	1.27
SGOT U/K	118	820	210
GGT UI/l	25	29	56
Fosf . alc.U/l	37	37	38
Urea mg %		29	.59
P mg. %	8.66	6.72	
Ca mg %	10.42	6.94	
Mg mg. %	2.03	2.8	
Microhem.	34		33
Neut. segm %	31		24
Eosinof %	3		1
Linf. %	66		75
Leucoc. mm <sup>3</sup>			10.900