

"INTOXICAÇÃO EM EQUINOS POR MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR *Fusarium moniliforme* NO NORTE DO PARANÁ"^d

ELISA YOKO HIROOKA^a
NEUSA MARIA ALVES VIOTTI^b
LÚCIA M.V. SOARES^c
AMAURI ALCINDO ALFIERI^b

RESUMO

*Leucoencefalomalácia comprometendo equino na região Norte do Paraná, associado à ingestão de milho mofado no 2º semestre de 1985 é descrita neste trabalho. O estudo dos sintomas clínicos, dados anátomo-histopatológicos, análise microbiológica e detecção de micotoxinas foram realizados nos casos ocorridos. Os sintomas clínicos foram predominantemente de origem nervosa, caracterizados principalmente por incoordenação motora, cegueira, depressão e hiperexcitação, ocorrendo a morte do animal dentro de 18 a 36 horas. No exame macroscópico do cérebro observou-se áreas de malácia, comprometendo a substância branca com amolecimento e cavitação. Estas áreas, no exame histopatológico, apresentavam necrose liquefativa, caracterizadas por células em degeneração, congestão de vasos, intenso edema e infiltrados perivascularares de células mono e polimorfonucleares. Nas amostras de ração foi observada alta contaminação fúngica, variando de 10^5 a 10^7 UFC/g de produto, isolando-se predominantemente *Fusarium moniliforme*. Quanto à presença de micotoxinas (zearalenona, esterigmatocistina, ocratoxina A e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) na ração, zearalenona foi detectada em duas amostras nas concentrações de 19,0mg/Kg (ração mista) e 0,7mg/Kg (resíduo de milho), não detectando-se outras toxinas.*

PALAVRAS-CHAVE: *Micotoxina; Fusarium moniliforme; Leucoencefalomalácia equina; Zearalenona.*

1 – INTRODUÇÃO

As micotoxicoses mais graves em equídeos são aquelas causadas por *Fusarium* sp. Entre elas, a doença do mi-

lho mofado, caracterizada por leucoencefalomalácia, descrita desde 1891 por MAYO nos EUA (citado por BRIDGE, 1978) e demonstrada em 1971 por WILSON & MARONPOT (1971) e WILSON et alii (1973) está associada pelo

a. Departamento de Patologia Geral – CCB/UEL

b. Departamento de Medicina Veterinária, Prev. Patol. Animal e Zootecnia – CCA/UEL

c. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

d. Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro; ao Dr. Urban L. Diener da Universidade de Alabama, USA, pela discussão; ao Dr. José Roberto Menezes do Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR, e Ilse Moreira do Laboratório de Microbiologia da FEA UNICAMP, pelo auxílio na identificação dos fungos; ao Dr. Paulo Cícero Werner pelo fornecimento de amostras.

menos em alguma instância com *Fusarium moniliforme*.

A doença típica tem ocorrido em países onde o milho (*Zea mays L.*) é consumido (BRIDGE, 1978).

O animal adquire a doença pela ingestão de milho contaminado por toxinas produzidas por *F. moniliforme* (WILSON & MARONPOT, 1971) e morre em média 72 horas após o início dos sinais clínicos (BRIDGE, 1978). As lesões cerebrais são características e na necrópsia de animais afetados, as áreas de malácia, envolvendo principalmente a matéria branca subcortical do cérebro, estão em estágio avançado de necrose liquefativa (BRIDGE, 1978; PIER, 1981; RIET-CORREA et alii, 1982; BARROS et alii, 1984).

As lesões parecem ser devidas a ação direta de micotoxinas ingeridas, já que o gênero *Fusarium* é o produtor de diversos metabólitos estrogênicos e tricotecenos (MARASAS et alii, 1979; MIROCHA et alii, 1979; UENO, 1983; OSBORNE & WILLIS, 1984; TRENHOLM et alii, 1985). A micotoxina de *Fusarium* sp, associada a efeito estrogênico é a zearalenona, porém, toxinas fatais pertencem ao grupo dos tricotecenos. Atualmente, conhecem-se mais de 50 destes sesquiterpenóides produzidos por fungos (TRENHOLM et alii, 1985). *F. moniliforme* é um patógeno primário de milho, capaz de produzir princípios eméticos, metabólitos estrogênicos, fusariocina A e B, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, moniliformina e ácido fusárico (BRIDGE, 1978; UENO, 1983). Porém, até o momento a toxina específica que produz leucoencefalomalácia equina não foi caracterizada (PIER, 1981; UENO 1983).

A leucoencefalomalácia ocorre em vários países (BRIDGE, 1978) e na América do Sul os primeiros relatos têm sido descritos na Argentina por RODRIGUES (1945). No Brasil a doença foi descrita por REGO (1950), RIET-CORREA et alii (1982), BRITO et alii (1982) e BARROS et alii (1984). Nestes trabalhos foi isolado o *F. moniliforme*, porém não se realizou a análise qualitativa e quantitativa de micotoxinas, fator decisivo na incriminação de componentes da ração animal na etiopatogenia da leucoencefalomalácia.

Este trabalho relata casos de leucoencefalomalácia ocorridos em equinos na região Norte do Paraná, de julho a setembro de 1985. A produção simultânea de várias micotoxinas por *Fusarium* sp é comum, assim a detecção de uma toxina pode indicar condições ambientais favoráveis para a produção de outras toxinas não analisadas nesta pesquisa.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Estudos anatomo-histopatológicos

Os casos de leucoencefalomalácia foram observados no município de Londrina e Cornélio Procopio durante o período de julho a setembro de 1985. Os dados clínicos e epidemiológicos foram estudados em três estabelecimentos (Quadro 1). A necrópsia foi realizada em dois animais

(estabelecimentos 1 e 2, equinos 1 e 2 respectivamente) e análises histopatológicas no equino 1.

Equino 1. Amostras da região do encéfalo, macroscopicamente alteradas, foram inoculadas em caldo infusão de coração e cérebro (BHI) e ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose e anaerobiose. Quanto a exame virológico de raiva, a parte danificada do encéfalo foi fixada em formol e glicerina e enviada para o laboratório Marcos Enrietti de Curitiba, PR. O fragmento do encéfalo alterado foi fixado em formol a 10,0% e seccionado com intervalos de 1cm de espessura e a superfície de corte destas secções examinadas. Fragmentos selecionados foram incluídos em parafina, cortados a 5µ e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para o exame histopatológico.

2.2 – Análise da ração

O estudo micológico e a análise de micotoxinas foram realizados em amostras de ração mista ou resíduo de milho consumidos pelos animais, coletados ao acaso nos três estabelecimentos (Quadro 1).

Micologia. As amostras de ração foram diluídas em série até 10^{-5} e plaqueadas em ágar batata dextrose (BDA), meio ágar côco (CAM) segundo LIM & DIANESE (1976) e CAM adicionado de tetraciclina, cloranfenicol e 0,5% de Triton x-100 (MOREIRA & SALZBERG, 1985). As placas foram incubadas a 25°C e 28°C, analisando-se o desenvolvimento da cultura e o aparecimento de fluorescência sob lâmpada ultravioleta (UV) num período de uma semana. A identificação baseou-se no aspecto microscópico e macroscópico das colônias isoladas. O gênero foi semeado em "Aspergillus differential medium" (ADM) segundo BOTHAST & FENNEL (1974).

O gênero *Fusarium* foi identificado segundo NELSON et alii (1983).

Deteção das micotoxinas. A presença e quantificação de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ e G₂, ocratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona na ração foi realizada utilizando-se padrões de micotoxinas de Makor Chemical Ltda, Israel. A extração e quantificação foram realizadas segundo o método de SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1985). Para a extração, 50,0g de amostra em duplicata foi homogeneizada com 30,0mL de KCL a 4,0% e 270,0mL de metanol, clarificada com (NH₄)₂SO₄ e terra de diatomácea, filtrada e tratada com N-hexano. A seguir, a amostra foi extraída com duas porções de 10,0mL de clorofórmio e 5,0mL de cada fração misturada e seca em banho a 80°C. O resíduo obtido foi redissolvido em metanol e procedeu-se à cromatografia em camada delgada (TLC) utilizando-se os solventes tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5+4+1), (6+4+0,05) e benzeno-metanol-ácido acético (90+5+5). A identificação foi feita sob luz UV, comparando-se os valores de R_f do padrão e das amostras. Co-cromatografia também foi utilizada. A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade da fluorescência das amostras com quantidades conhecidas de micotoxinas. A confirmação da presença de zearalenona e esterigmatocistina foi realizada pulverizando-se a placa com solução alcóolica de AlCl₃ a 20,0%.

QUADRO 1

Leucoencefalomalácia em equinos no Norte do Paraná

NÚMERO DO ESTABELECIMENTO	TIPO DE ALIMENTAÇÃO	RECEBERAM ALIMENTAÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS AFETADOS	MORTOS	LOCALIDADE
1	Ração mista	15	8	7	Londrina
2	Resíduo de milho	2	2	2	Cornélio Procópio
3	Resíduo de milho	1	1	1	Cornélio Procópio

3 – RESULTADOS

3.1 – Sintomas clínicos

Os sinais clínicos predominantes observados em todos os equinos afetados nas três propriedades foram inicialmente anorexia, distúrbios nervosos com incoordenação motora e membros entre-abertos, às vezes cruzados; os animais caminhavam para trás, andavam em círculos e pressionavam a cabeça contra objetos e parede da baía. Também apresentavam cegueira, depressão, hiperexcitação frente a estímulos e nas fases finais, observava-se decúbito lateral com movimentos de pedalagem. O aumento da temperatura corporal não foi constatado no decorrer da evolução clínica. A morte nos casos estudados ocorreu entre 18 a 36 horas. A figura 1 mostra o aspecto de um dos animais acometidos.

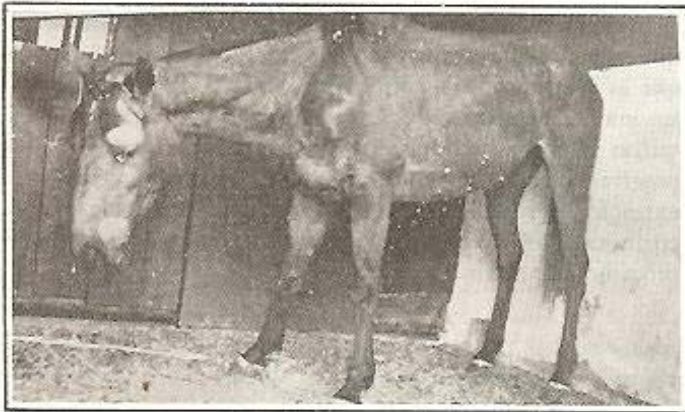


FIGURA 1 – Equino 1 com incordenação motora e lesões na região supraorbitária devido à cegueira e traumatismo da cabeça

3.2 – Estudos anátomo-histopatológicos

a) Alterações macroscópicas. No lado esquerdo, na parte superior do cérebro do equino 1, observou-se uma área arredondada de aproximadamente 7,0cm, de coloração amarelada e consistência gelatinosa com pontos de hemorragia. Ao corte, a referida área mostrou-se totalmente amolecida com necrose liquefativa, abrangendo a substância branca e parte da cinzenta (figura 2). Recortando-se o cérebro e o cerebelo, foi observada outra área de amolecimento localizada no lado direito do encéfalo, de aproximadamente 2,0cm de diâmetro, de aspecto idêntico

anteriormente descrito. Observou-se ainda congestão hepática e rins aumentados de volume e congestos. Os outros órgãos apresentaram-se normais. Quanto ao aspecto das lesões cerebrais e de outros órgãos no equino 2 foi bastante semelhante ao do equino 1.

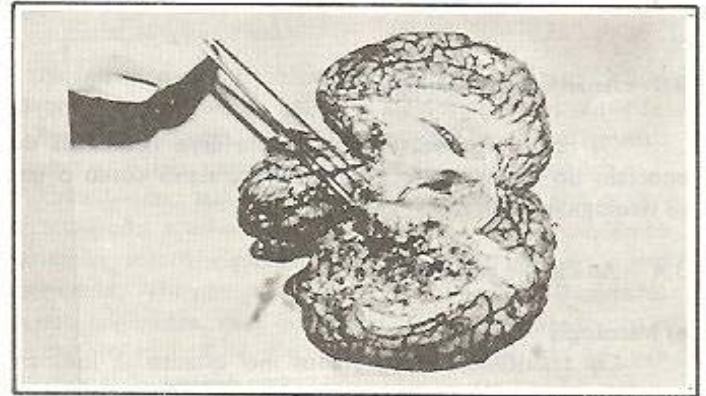


FIGURA 2 – Corte sagital de cérebro equino com área de necrose liquefativa, de aspecto gelatinoso com pontos hemorrágicos e edema

b) Alterações microscópicas. O exame histopatológico foi realizado com material preparado do cérebro, cerebelo e ponte do equino 1 (figura 3 e 4). As lesões localizaram-se principalmente na substância branca, observando-se áreas de necrose liquefativa caracterizadas por muitas células em degeneração com núcleo em picnose, cariorréxia e desaparecimento das células. Os vasos da área de necrose se mostraram congestos, ocorrendo edema intenso caracterizado por substância amorfa, homogênea e fracamente eosinofílica. No tecido nervoso, observou-se infiltração difusa perivascular de mononucleares (linfócitos e plasmócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), assim como aumento significativo das células da glia. Na substância cinzenta, as lesões ocorrem com menor intensidade, observando-se alguns neurônios em degeneração, i.e., neurônios contraídos, acidofilia mais acentuada, hiperchromatismo e gliose difusa. As áreas próximas à substância branca apresentavam microcavitações e presença de macrófagos. Nas meninges, observou-se congestão intensa, edema acentuado e infiltrado misto, ou seja, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. A desmielinização caracterizou-se por inúmeras microcavitações, conferindo à substância branca o aspecto frouxo, observando-se macrófagos ("gitter cells").

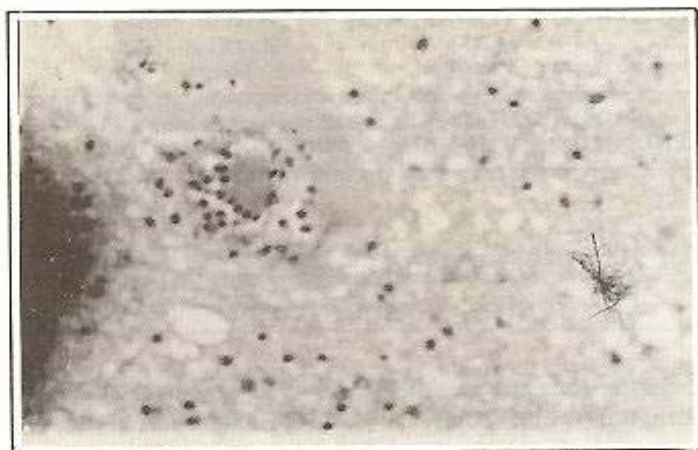


FIGURA 3 — Cérebro de equino 1 mostrando microcavitações difusas e edema associado ao infiltrado misto perivascular. HE, obj. 10x.

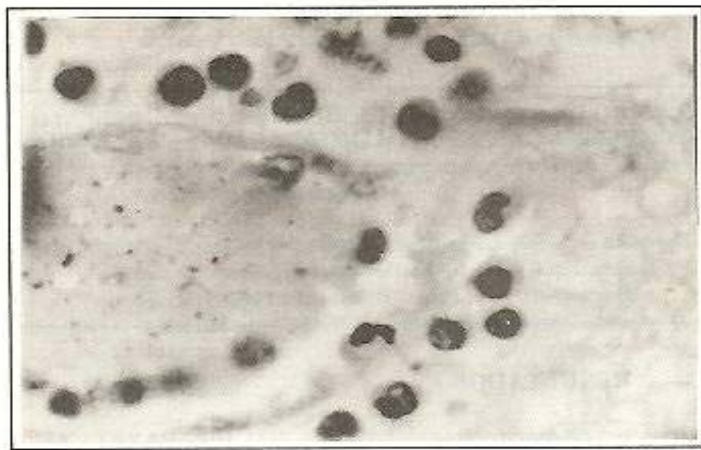


FIGURA 4 — Detalhe da Fig. 3 mostrando células do infiltrado e necrose com núcleo em cariorrexis, picnose e hiper cromáticos. HE, obj. 40x.

3.3 — Análise microbiológica

Os resultados bacteriológicos da área necrosada do encefalo do equino 1 foram negativos, assim como o teste virológico para raiva.

3.4 — Análise de ração

a) Micologia

Os resultados apresentados no quadro 2 indicam que as amostras de ração consumidas por equinos afetados apresentavam alta contaminação fúngica, com a predominância de *F. moniliforme*. Da contagem total de bolores (Quadro 2), as colônias com aspecto de *Fusarium* sp nas amostras 2 e 3 atingiram em torno de $8,0 \times 10^5$ e $1,8 \times 10^5$ UFC/g respectivamente a 25°C; amostras 1, 2 e 3 analisadas a 28°C apresentaram $1,0 \times 10^7$, $3,0 \times 10^5$ e $8,0 \times 10^5$ UFC/g respectivamente. Todas as linhagens de *Penicillium* sp isoladas apresentaram fluorescência esverdeada quando analisadas

sob luz ultravioleta, indicando serem possíveis produtores de citrinina. Quanto às linhagens de *Aspergillus* sp isoladas, várias pertenceram ao grupo *A. flavus* de acordo com BOTHAST & FENNELL (1975).

b) Micotoxinas

Durante os processos de extração para análise cromatográfica de micotoxinas, observou-se que todas as amostras de alimentação animal estudadas apresentavam como principal componente, o milho. Estes dados reforçam a presença maciça de *F. moniliforme* nas amostras analisadas, já que este fungo é um parasito de milho. O quadro 3 mostra que as amostras 1 e 2 continham 19,0 e 0,7 mg/Kg de zearalenona respectivamente, apresentando-se negativas para outras micotoxinas. Na amostra 3 a quantificação não foi possível devido a impurezas não removidas durante a extração. Embora não tenha sido utilizado padrão para citrinina, não se observou nenhum componente com Rf próximo à de citrinina na placa da TLC.

QUADRO II

Contagem total e fungos isolados das amostras de alimentos utilizados nos casos de leucoencefalomalácia equina.

CASO	TIPO DE ALIMENTAÇÃO	CONTAGEM TOTAL DE BOLORES UFC ^a /g		FUNGOS ISOLADOS
		25°C	28°C	
1	Ração mista	—	$1,6 \times 10^7$ ($1,0 \times 10^7$)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, grupo <i>A. flavus</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
2	Resíduo de milho	$3,2 \times 10^6$ ($8,0 \times 10^5$)	$2,1 \times 10^6$ ($3,0 \times 10^5$)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp, grupo <i>A. flavus</i> , <i>Phoma</i> sp. Mucoraceae.
3	Resíduo de milho	$2,8 \times 10^5$ ($1,8 \times 10^5$)	$8,5 \times 10^5$ ($8,0 \times 10^5$)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, grupo <i>A. flavus</i> , Mucoraceae.

a — Unidade formadora de colônia

b — () contagem de colônia com aspecto de *Fusarium* sp.

QUADRO III

Detecção e quantificação das micotoxinas nas rações consumidas por equino nos casos de Leucoencefalomalácia.

AMOSTRA	TIPO DE ALIMENTAÇÃO	AFLATOXINAS (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	MICOTOXINAS (mg/Kg)		
			ESTERIGMATOCISTINA	OCRATOXINA	ZEARALENONA
1	Ração mista	ND	ND	ND	19,0
2	Resíduo de milho	ND	ND	ND	0,7
3	Resíduo de milho	ND	ND	ND	Nada a afirmar

ND – não detectado

4 – DISCUSSÃO

Os sinais clínicos, dados de necrópsia, análise histopatológica, resultados microbiológicos e de micotoxinas, nos permitiram o diagnóstico de leucoencefalomalácia nos casos estudados.

As lesões foram predominantemente de congestão, edema e infiltrados mistos, perivasculares ou difusos, em diferentes graus e segmentos do SNC, especialmente na substância branca. A desmielinização foi discreta, e os sinais clínicos observados neste trabalho foram compatíveis com os descritos por BRIDGE (1978), RIET-CORREA et alii (1982) e BARROS et alii (1984). Sintomas semelhantes são observados na encefalomielite equina (BEER 1981), mas a evolução da doença até a morte é mais rápida na leucoencefalomalácia, além de não ocorrerem picos febris. Principalmente no que diz respeito a lesões anatomopatológicas de cérebro, na encefalomielite não ocorre necrose liquefativa e o comprometimento é maior na substância cinzenta (BEER 1981).

A alta contaminação fúngica, constituída na sua maioria por *F. moniliforme*, atingindo a contagem em torno de 10⁶/g e a detecção de zearalenona em dois dos produtos analisados, é uma evidência complementar para a confirmação do diagnóstico. *F. moniliforme* tem sido responsável por leucoencefalomalácia em casos experimentais (WILSON & MARONPOT, 1971; WILSON et alii, 1973), sendo isolado, também, por RIET-CORREA et alii (1982) e BARROS et alii (1984) de milho ingerido por animais que desenvolveram sintomatologia clínica. Zearalenona, um dos metabólitos secundários de fungo, com ação estrogênica, não é fatal. Porém, sendo rara a ocorrência isolada de toxina de *Fusarium* sp, os resultados indicam a presença de toxinas muito potentes, que causaram a morte dos animais (BRIDGE, 1978; UENO, 1983; EL-BANNA et alii, 1984; HAGLER et alii, 1984).

O primeiro caso de leucoencefalomalácia (estabelecimento 1) ocorreu em julho de 1985, e o grau alarmante de contaminação da ração foi comunicado ao produtor. Porém, o fornecimento desta ração não foi interrompido devido à escassez de alimentos causada pela estiagem e conseqüentemente, mais casos de leucoencefalomalácia surgiram em setembro.

Embora a fusariose seja considerada uma doença de regiões de clima temperado (MARASAS et alii, 1979;

MIROCHA et alii, 1979; SUTTON et alii, 1980; OSBORNE & WILLIS, 1984), a mesma é relativamente comum nas plantações da Região de Londrina. Um levantamento recentemente realizado pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR em várias regiões do Estado (comunicação pessoal, Dr. J.R. Menezes), mostra que, inclusive os milhos selecionados para o plantio estão altamente contaminados com *F. moniliforme*, atingindo em alguns lotes 60 a 70% dos grãos analisados. Esta observação em amostras de milho indica a necessidade de quantificação de contaminação fúngica e detecção de micotoxinas nas rações implicadas em casos de intoxicação, não se restringindo somente ao isolamento e identificação do fungo.

O desenvolvimento de *Fusarium* sp e suas respectivas toxinas, está intimamente relacionado com a umidade (SUTTON et alii, 1980; BARROS et alii, 1984) e apesar do melhor crescimento micelial ocorrer entre 18 a 25°C, a baixa temperatura favorece a produção de toxina (PALT, citado por PIER, 1981; ORTH, 1981). *Fusarium* sp pode ser encontrado no campo durante todas estações do ano, mas parece que o frio funciona como choque térmico indutor da produção de toxinas (ORTH, 1981). As condições climáticas compatíveis com a produção destas toxinas ocorrem anualmente em nossa região, coincidindo com a época dos casos estudados, que ocorreram após uma geada.

Esta ração também é utilizada para bovinos e outros ruminantes da região. Entretanto, casos graves acometeram somente animais monogástricos. A explicação seria que nos ruminantes, os microrganismos do rumem desempenham papel de biodigestor, capaz de metabolizar várias toxinas (KIESSLING et alii, 1984).

Nas amostras de ração estudadas também foram isoladas as linhagens de *Penicillium* sp e *Aspergillus* pertencentes ao grupo *A. flavus*, possíveis produtores de toxinas. Porém nas amostras não foram detectadas aflatoxinas e ocratoxina, não tendo sido analisado a presença de citrinina. Entretanto, segundo Dr. U.L. Diener (comunicação pessoal) a ingestão de 5 a 10g de citrinina por equino não foi fatal, descartando o envolvimento desta toxina nos casos estudados.

O problema de fusariotoxicose não se restringe à Medicina Veterinária, devendo-se ressaltar a sua importância em Saúde Pública e, intoxicação como ATA (alimentary toxic aleukia), com elevada mortalidade dos indivíduos tem sido relatada na URSS (PIER, 1981).

ABSTRACT

An episode of leukoencephalomalacia during the second semester of 1985, involving horses in the North of Paraná, is related to the ingestion of moldy corn. The present paper describes the pertaining clinical symptomatology as well as histopathology, microbiological data and mycotoxin analysis. The clinical signs pointed to neurologic disturbances and induced locomotor abnormalities, blindness, depression and hyperexcitation. Death occurred 18 to 36 hours after the feed was consumed. At the macroscopic examination, the brain revealed malacic areas involving softening and cavitation of white matter. These same areas exhibited liquefactive necrosis, intense edema and perivascular infiltration of mono and polymorphonuclear cells. The samples were highly contaminated by molds, ranging from 10^5 to 10^7 CFU/g by product. The main isolated fungi was *Fusarium moniliforme*. When these feed samples were analysed for aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 and G_2 plus sterigmatocystin, ochratoxin A and zearalenone), zearalenone was detected in two samples at the level of 19.0mg/Kg (mixed feed) and 0.7mg/Kg (corn feed).

KEY WORDS: Mycotoxins; *Fusarium moniliforme*; Equine leukoencephalomalacia; Zearalenone.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS, C.S.L.; BARROS, S.L.; SANTOS, M.N.; SOUZA, M.A. Leucoencefalomalácia em equinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 4: 101-107, 1984.
2. BEER, J. *Enfermedades infecciosas de los animales domesticos. I. Enfermedades víricas, infecciones por clamídeas, rickettsioses, micoplasmosis.* Zaragoza, Acribia, 1981. 453p.
3. BOTHAST, R.J. & FENNEL, D.I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, 66: 365-369, 1974.
4. BRIDGE, C.H. Mycotoxicoses in horses. In: WILLIE, T.D. & MOREHOUSE, L.G. *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses.* New York, Marcel Dekker, 1978. V.2, p. 173-81.
5. BRITO, L.A.B.; NOGUEIRA, R.H.G.; PEREIRA, J.J.; CHQUILOFF, M.A.G.; BIONDINI, J. Leucoencefalomalácia em equino associada à ingestão de milho mofado. *Arqs Es. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, 34: 49-53, 1982.
6. EL-BANNA, A.A.; SCOTT, P.M.; LAU, P.; SAKUMA, T.; PLATT, H.W.; CAMPBELL, V. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucium* in potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1169-1171, 1984.
7. HAGLER, W.M.; TYCZKOWSKA, K.; HAMILTON, P.B. Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the Midwestern United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 151-154, 1984.
8. KIESSLING, K.; PETERSON, H.; SANDHOLM, K.; OLSEN, M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1070-1073, 1984.
9. LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66: 1466-1469, 1976.
10. MARASAS, W.F.O.; LEISTNER, L.; HOFMANN, G.; ECKARDT, C. Occurrence of toxigenic strains of *Fusarium* in maize and barley in Germany. *Eur. J. Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 7: 289-305, 1979.
11. MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B.; CHRISTENSEN, C.M.; NIKU-PAAVOLA, M.L.; NUMMI, N. Incidence of zearalenol (*Fusarium* mycotoxin) in animal feed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 749-750, 1979.
12. MOREIRA, I. & SALZBERG, S.P.C. Modificação do meio de ágar côco adicionado de antibiótico (CAM-AB) para a triagem de fungos toxigênicos em cereais. ENCONTRO NACIONAL DE MICOLOGIA, II. Resumos. Recife, 1985. p. 68.
13. NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium species. An illustrated manual for identification.* Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.
14. ORTH, R. Einfluss Physikalischer Faktoren auf die Bildung von Mykotoxinen. In: REISS, J. *Mykotoxine in Lebensmitteln.* Stuttgart & New York, Gustav Fischer, 1981. p.85-100.
15. OSBORNE, B.G. & WILLIS, K.H. Studies in to the occurrence of some trichothecene mycotoxins in UK home-grown wheat and imported wheat. *J. Sci. Food Agric.*, 35: 579-583, 1984.
16. PIER, A.C. Mycotoxins and animal health. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 25: 185-243, 1981.
17. REGO, C.L. Doença de sintomatologia nervosa causada por intoxicação pelo milho. *Revista Milit. Remonta Vet. RJ.*, 10: 199-215, 1950.
18. RIET-CORREA, F.; MEIRELLES, M.A.; SOARES, J.M.; MACHADO, J.J.; ZAMBRANO, A. F. Leucoencefalomalácia em equinos associada à ingestão de milho mofado. *Pesq. Vet. Bras.*, 2: 27-30, 1982.
19. RODRIGUEZ, J.A. Diferenciación ente la enfermedad de los rastrojos y la meningo encefalomiélitis infecciosa de los equinos. *Anales Soc. Argentina*, 69: 305-307, 1945.