

EFEITO DA VIRGINIAMICINA SOBRE A MICROBIOTA COLÔNICA DE EQUINOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA EXPERIMENTAL POR CARBOIDRATOS*

EFFECT OF VIRGINIAMYCIN ON COLONIC MICROBIOTA OF THE EQUINES IN CARBOIDRATES OVERLOAD

Milena Alves Maia¹, Érica Cristina Rocha Roier², Tatiana Pessoa dos Reis², Rita de Cássia Campbell Machado Botteon³, Miliane Moreira de Souza⁴ e Paulo de Tarso Landgraf Botteon³

ABSTRACT. Maia M.A., Roier C.R., Reis T.P., Botteon R.C.C.M., de Souza M.M. & Botteon P.T.L. [Effect of virginiamycin on colonic microbiota of the equines in carbohydrates overload]. Efeito da virginiamicina sobre a microbiota colônica de equinos submetidos à sobrecarga experimental por carboidratos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4):229-233, 2010. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 07, Seropédica, 23890-000, RJ, Brasil. E-mail: pbotteon@ufrj.br

The aim of this work was to evaluate the changes of aerobic microbiota in the colon of horses subjected to carbohydrate overload (CO) and to verify the effect of virginiamycin administered at different times on the colonic microbiota. Were used four colostomized horses in a randomized 4x4 cross over design. The animals were subjected to CO and treated with different doses of virginiamycin (V), in according to the treatments of V: C (control) = 0 mg, V0=5 mg V at zero hours after CO (ACO); V12 V = 5mg at 12 hours ACO; V0-12 = 5mg of V at zero hours ACO and 5mg of V at 12 hours ACO. The initial microbiota was related Gram positive / Gram-negative bacteria of the order of 53% and 46% respectively. Was isolated the gram-negatives bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubideae*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*. And the gram-positive bacteria: *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Listeria* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., and Levedures. The administration of virginiamycin simultaneously to CO inhibited the growth of gram-positive bacteria, but does not prevent the reduction of pH and death of Gram-negative bacteria. Virginiamycin 12 hours ACO reduced the population of gram-positive and promoted an increase in pH. We conclude that administration of virginiamycin simultaneously with carbohydrate overload or 12 hours later may be beneficial for control of the population of gram-positive bacteria, producing lactic acid.

KEY WORDS. *Equine, virginiamycin, bacterial community, hindgut acidosis*

RESUMO. Com o objetivo de avaliar as alterações da microbiota aeróbia no colo de equinos submetidos à sobrecarga por carboidratos (SC) e verificar o efeito da virginiamicina administrada em diferentes momentos sobre a microbiota colônica, foram utilizados quatro equinos colostomizados em um delineamento “cross

*Recebido em 6 de julho de 2010

Aceito em 23 de setembro de 2010

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.
- Bolsista de IC-PIBIC (CNPq/UFRRJ).

² Médica-veterinária, *M. Med. Vet.*, Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000.

³ Médico-veterinário, *Dr. CsVs*. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ. BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: pbotteon@ufrj.br

⁴ Médica-veterinária, *Dr. CsVs* Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV, UFRRJ. BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: miliane@ufrj.br

over” 4x4. Os animais foram submetidos a SC e tratados com diferentes doses de virginiamicina (V), de acordo com os tratamentos C = 0mg de V; V0 = 5mg de V na hora zero após SC; V12 = 5mg de V na hora 12 após SC; V0-12 = 5mg de V na hora zero após SC e 5mg de V na hora 12 após SC. A microbiota inicial apresentou relação Gram-positivas / Gram-negativas da ordem de 53% e 46%, respectivamente. Foram isoladas as gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubideae*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*. E as gram-positivas *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Listeria* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e Leveduras. A administração de virginiamicina simultaneamente às SC inibiu o crescimento de bactérias gram-positivas, mas não impediu a redução do pH e a morte de bactérias gram-negativas. Virginiamicina 12 horas após a SC reduziu a população de bactérias gram-positivas e promoveu elevação do pH. Conclui-se que a administração de virginiamicina simultaneamente com a sobrecarga por carboidratos ou 12 horas após, pode ser benéfica, pelo controle da população de bactérias gram-positivas, produtoras de ácido lático.

PALAVRAS-CHAVE. Equinos, virginiamicina, população bacteriana, acidose intestinal.

INTRODUÇÃO

O processo evolutivo do equino permitiu a este animal obter nutrientes a partir de forragens. Seu sistema digestivo possui adaptações que lhe permite, em conjunto com a microbiota interna, o aproveitamento de alimentos relativamente pobres. Carboidratos solúveis, proteínas e lipídeos, em geral são digeridos na porção pré-cecal, predominantemente enzimática. Na porção pós-ileal, carboidratos e proteínas não digeridos na primeira etapa e a fração fibrosa da dieta sofrem então digestão microbiana, de onde os equinos obtêm a maioria das suas necessidades de energia da absorção de ácidos graxos voláteis (AGV), principalmente acetato, propionato e butirato, produzidos a partir da fermentação microbiana no intestino grosso (Goodson et al. 1988). Estes AGV têm um papel particularmente importante na saúde e na homeostase do hospedeiro. Acetato constitui uma fonte de energia para muitos tecidos, incluindo o coração, o tecido muscular, e o cérebro; propionato é o principal precursor para a gliconeogênese, e butirato fornece uma fonte de energia para colonócitos, podendo atuar na regulação e diferenciação do epitélio intestinal (Julliard et al. 2001). O aumento na quantidade de carboidratos solúveis na dieta pode ultrapassar a capacidade digestiva

da porção enzimática, disponibilizando carboidratos solúveis para a digestão microbiana, o que promove alterações na microbiota cecal e colônica, com elevada produção de AGV e, sobretudo lactato (Garner et al. 1977, 1978, Moore et al. 1979), o que leva a uma significativa diminuição do pH cecal, havendo proliferação de bactérias produtoras de ácido lático e morte de bactérias celulolíticas. O acúmulo de ácido lático durante a fermentação pode ser controlado com o uso de antibióticos que tenham atividade sobre bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp., que são os principais responsáveis pela produção de ácido lático e pela queda do pH cecal (Al Jassim & Andrews 2009, Pollitt & Visser 2010). A virginiamicina teve seu efeito de controle do acúmulo de ácido lático, comprovado em estudos com ovelhas e equinos, como profilático (Rowe, et al. 1994). O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações da microbiota aeróbia no colo de equinos submetidos à sobrecarga por carboidratos e verificar o efeito da virginiamicina administrada em diferentes momentos sobre a microbiota colônica, em animais submetidos à sobrecarga experimental por carboidratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste trabalho seguiram os princípios éticos na experimentação animal recomendados pelo Cobeia (2009).

Foram utilizados quatro equinos adultos, provenientes do Curral de Apreensão da UFRRJ. Esses animais foram submetidos a uma avaliação clínica completa, sendo incluídos no estudo somente animais hígidos. Os animais foram alimentados com dieta composta por feno de capim *Coast cross* e concentrado, na proporção volumoso: concentrado de 70:30.

Após avaliação clínica os animais foram submetidos à cirurgia de colostomia, no colo ventral direito, segundo a técnica de Lopes et al. (2010) modificada⁵, com introdução de cânulas de silicone. Após a cirurgia, foram mantidos em baias individuais de 4x4m, com piso concretado providas de bebedouro e comedouro até que estivessem recuperados da cirurgia e adaptados às cânulas, recebendo a mesma dieta oferecida no período pré-operatório. Para evitar o estresse provocado pelo confinamento os animais foram exercitados ao passo, diariamente, conduzidos pelo cabresto.

Para verificar as alterações da microbiota frente à sobrecarga por carboidratos e o efeito do tratamento

⁵ Dados não publicados (Marco A.F. Lopes, MV, MS, PhD, Department of Large Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, 501 D W Brooks Drive, Athens, GA 30602.)

com virginiamicina, foram utilizados quatro tratamentos, onde, para promoção da sobrecarga por carboidratos, todos receberam a administração de amido de milho na proporção de 17,6g por quilograma de peso vivo através de sonda nasogástrica (Garner et al. 1975, Garner et al. 1977, Krouger et al. 1986, Weiss et al. 1994). A virginiamicina foi administrada na dose de 5 mg/kg de peso vivo conforme a descrição a seguir,

Tratamento controle (C) = amido de milho

Tratamento (V0) = amido de milho + virginiamicina no momento da sobrecarga

Tratamento (V12) = amido de milho + virginiamicina 12 horas após a sobrecarga

Tratamento (V0-12) = amido de milho + virginiamicina no momento da sobrecarga e 12 horas após a sobrecarga.

O protocolo experimental constou de quatro períodos de trinta dias em que os três primeiros dias foram para administração de amido e virginiamicina e coleta de conteúdo colônico e os 27 dias subsequentes destinados à recuperação e readaptação à dieta básica inicial, num delineamento *cross-over* 4x4 em que a ordem dos tratamentos foi distribuída aleatoriamente.

Amostras de aproximadamente 100 mL do conteúdo colônico foram colhidas através da fistula em oito momentos: imediatamente antes da indução de sobrecarga (hora 0) e após 12, 24, 36, 48 horas. Imediatamente após a colheita foi determinado o pH de cada amostra através de um potenciômetro⁶. Alíquotas de 1 mL foram semeadas diretamente em Agar sangue carneiro 5% e submetidas a diluições decimais em solução salina estéril e posteriormente semeadas em duplicata em PCA (Plate Count Agar) e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Das amostras inoculadas em Agar sangue, após incubação procedeu-se à avaliação das características morfológicas das colônias e inóculos individuais foram semeados em meios seletivos e diferenciais, para observação dos aspectos fenotípicos característicos dos gêneros (Koneman et al. 2008).

Os microrganismos isolados foram inicialmente estudados morfológicamente pelo método de Gram e repicados em caldo cérebro coração (BHI), incubadas a 37°C por 48 horas quando então foram realizadas as provas taxonômicas para identificação dos gêneros e espécies segundo Krieg & Holt (1984). Amostras semeadas em PCA foram incubadas por 48 horas foram utilizadas para contagem do número total de UFC.

Para análise estatística, os dados de contagem UFC/ml foram submetidos à transformação logarítmica, porém não se obteve a normalização dos dados, sendo,

então, analisados através do método de Kruskal-Wallis, a um nível de 5% de significância. Os valores de pH foram avaliados pelo teste ANOVA, seguidos pelo teste Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microbiota isolada dos animais antes da sobrecarga e sem a influência da Virginiamicina apresentou uma relação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da ordem de 53% e 46%, respectivamente. Dentre as bactérias isoladas, destacaram-se as Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubideae*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii* e as bactérias Gram-positivas *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Listeria* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e Leveduras. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) média foi de $1,2 \times 10^7$ UFC/ml. A dieta básica, que já contemplava a suplementação com concentrados (30%), pode explicar o predomínio de bactérias Gram-positiva observada neste trabalho. Segundo Jullian et al. (2001), alterações na microbiota do intestino grosso, decorrentes da ingestão de grãos, podem ser observadas a partir de 10 a 14 dias da administração da dieta e o número de bactérias presentes no ceco e no cólon, que sintetizam lactato, como *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp. aumenta, enquanto o número de bactérias celulolíticas diminui. Mesmo com oferta de 2,3g/kg de peso corporal/refeição, inferior à dose de 4g/kg peso corporal/refeição, estabelecida como preventiva contra distúrbios digestivos (Potter et al. 1992). Existem evidências que mostram que pouco mais de 50% do amido é sujeito a digestão pré-cecal. Desta forma, não apenas o processamento, mas a quantidade de amido ingerido influencia diretamente na digestão. Como o equino apresenta apenas 10% da secreção de amilase pancreática apresentada por um suíno, grandes quantidades de amido podem passar pelo ID sem serem aproveitadas, chegando assim ao intestino grosso (Pagan 1998).

Houve um significativo ($p < 0,05$) aumento no número de UFC/ml da ordem de 10^7 para 10^9 entre 12 e 36 horas após a administração do carboidrato e, 48 horas após, observou-se um redução para níveis semelhantes à contagem de UFC/ml verificadas no início do tratamento (Figura 1). Este crescimento foi acompanhado de uma modificação na relação entre as bactérias que compunham a microbiota colônica destes animais. *Lactobacillus* sp. e *Listeria* sp., seguidas de *Staphylococcus* e por último *Streptococcus* sp. foram as que apresentaram maior crescimento, enquanto as espécies de enterobacteriáceas tiveram decréscimo na população.

⁶ PH 300 – Bio Sear®

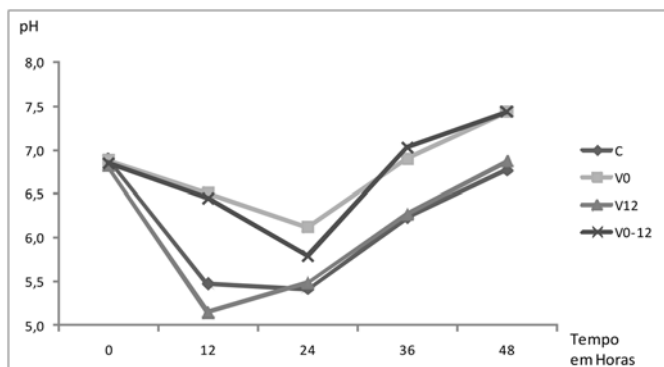


Figura 1. Variação do pH do conteúdo colônico de equinos nos intervalos zero, 12, 24, 36 e 48 horas após a indução da sobrecarga por amido (ISA) de acordo com o tratamento: Controle (C); 5g/100kg PV de Virginiamicina no momento da ISA (V0); 5g/100kg PV de Virginiamicina 12h após ISA (V12); 5g/100kg PV de Virginiamicina 0h e 12h após ISA (V0-12).

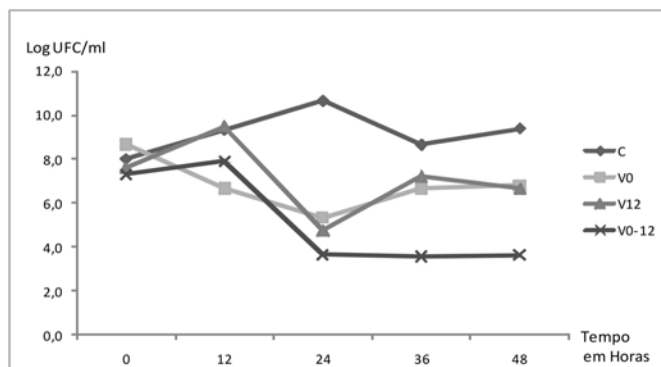


Figura 2. Logaritmo do número de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) do conteúdo colônico de equinos nos intervalos zero, 12, 24, 36 e 48 horas, após a indução da sobrecarga por amido (ISA) de acordo com o tratamento: Controle (C); 5g/100kg PV de Virginiamicina no momento da ISA (V0); 5g/100kg PV de Virginiamicina 12h após ISA (V12); 5g/100kg PV de Virginiamicina 0h e 12h após ISA (V0-12).

A dinâmica populacional observada no grupo controle, é semelhante à descrição feita por Garner et al. (1978), em procedimento experimental idêntico ao utilizado neste trabalho. Os autores relatam ainda, que *Streptococcus* sp. apresentava população em valores similares aos observados nos pré-tratamentos. Em trabalho recente, Milinovich et al. (2007) monitoraram as alterações da microbiota cecal de equinos, utilizando hibridização fluorescente in situ (FISH). Laminite foi induzida em todos os cavalos após a administração oral de oligofrutose em dose relativamente elevada (10 g / kg de peso corporal). A população de bactérias Gram-positivas passou de menos de 20% no momento da administração a mais de 70% entre 4 e 8 horas após a administração de oligofrutose (AOP) e permaneceram em níveis elevados até 32 horas AOP.

Das amostras obtidas a partir dos animais do tratamento VO deste estudo, observou-se um decréscimo do número de UFC/ml 12 horas após a indução, atingindo o menor número 24 horas após a indução e, retornando a valores semelhantes aos observados inicialmente da hora 12, às 36 e 48 horas, após a indução. Além da diminuição da população total de bactérias entre 12 e 24 horas após a indução, verificou-se que esta diminuição deveu-se principalmente à redução das espécies de enterobactérias, enquanto bactérias Gram positivas, como *Listeria* sp., *Staphilococcus* sp., e *Lactobacillus* sp. mantiveram as populações praticamente estáveis, diferindo do observado no tratamento controle. Nos tratamentos em que a virginiamicina foi administrada juntamente com o carboidrato (V0 e V0-12), houve acidificação do conteúdo intestinal, porém em menor intensidade. O menor valor de pH observado nesses tratamentos foi 5,8 (Figura 2). Os dados permitem inferir que a virginiamicina minimizou os efeitos do crescimento de bactérias Gram

positivas, com redução da produção de ácido lático, mas não impediu a morte de bactérias Gram negativas. Segundo Hoffman (2009), valores de pH menores que 6,0 aumentam o risco de endotoxemia, pois são indicativos de acidose subclínica e há possibilidade de haver lesão na mucosa intestinal permitindo a passagem de endotoxinas do lúmen para a circulação.

Para os tratamentos que não receberam virginiamicina no momento da indução, o grupo V12, à semelhança do que ocorreu com o grupo C, apresentou um aumento do número de UFC/ml até 12 horas após a administração do amido, $3,5 \times 10^9$. A partir deste momento, com a administração da Virginiamicina, houve uma inversão desta tendência, observando-se contagem total de UFC/ml da ordem de $3,5 \times 10^4$ às 24 horas. Na Figura 1, observa-se o valor do logaritmo na base 10 ($\log_{10} = 4,8$), e novo crescimento chegando a 8×10^7 UFC/ml ($\log_{10} = 7,2$) 36 horas após a administração de amido. Observa-se neste tratamento que o efeito do antibiótico não se manifesta por mais de 12 horas. Quanto às espécies de bactérias isoladas, não foram identificadas bactérias Gram negativas, as 12 e 24 horas após a indução da sobrecarga, identificando-se espécies de enterobactérias, somente a partir de 36 horas. Dentre as Gram-positivas, houve aumento de *Lactobacillus* sp., *Listeria* sp., *Staphilococcus* sp. e *Streptococcus* sp. até 12 horas, e diminuição de *Staphilococcus* sp. e *Streptococcus* sp., houve manutenção da população de *Listeria* sp., e *Lactobacillus* sp. não foi isolado a partir de 24 horas da indução. Estes dados nos permitem concluir que a Virginiamicina foi efetiva em inibir o crescimento de *Staphilococcus* sp., *Streptococcus* sp e *Lactobacillus* sp. Os valores de pH nestes tratamentos declinaram na medida em que a população de bactérias Gram-positivas aumentou, observando-se maior

acidificação, com pH entre 5,1 às 12 horas no tratamento V12 e 5,4 no grupo controle (C).

No último tratamento, V0-12, houve um ligeiro aumento do número de UFC/ml entre a indução da sobrecarga e 12 horas, variando de $1,2 \times 10^6$ para $4,5 \times 10^6$; isto se deu principalmente pelo crescimento de Leveduras, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., ao mesmo tempo em que houve uma diminuição da população de bactérias Gram negativas. A partir da segunda dose de Virginiamicina, às 12 h, houve diminuição de vários grupos de bactérias, sendo isolados apenas *Bacillus* sp., entre os Gram negativos, e *Listeria* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. entre as Gram positivas. Bactérias Gram positivas responsáveis pela produção de ácido láctico resultantes da sobrecarga por carboidratos são sensíveis a uma gama de antibióticos. A indução de laminite após a sobrecarga por carboidrato não ocorrerá se o crescimento bacteriano for controlado (Milinovich et al. 2010). Virginiamicina, quando administrada na dose de 5g/Kg de peso vivo, quatro dias antes da sobrecarga por carboidratos impediu a ocorrência de laminite e produção de ácido D-lático em todos os casos (Pollitt 1996). Segundo Rowe (1995), a administração de virginiamicina, 6 a 8 horas após a sobrecarga ou administração de carboidrato, não impede a ocorrência de laminite, recomendando seu uso apenas como profilático. Neste estudo verificou-se que o uso da virginiamicina pode ser benéfico, mesmo após a ocorrência da sobrecarga por carboidratos, uma vez que houve menor variação do pH e da população de bactérias Gram-positivas após a administração da virginiamicina em todos os tratamentos. Esses dados apontam para a possibilidade de utilização da virginiamicina, na prevenção dos efeitos deletérios da sobrecarga por carboidratos, após a ingestão, fato que contribui para a prática clínica, visto que em muitas situações não é possível prever a ingestão excessiva de carboidratos.

CONCLUSÃO

Através destes resultados, conclui-se que a administração de Virginiamicina simultaneamente com a sobrecarga por carboidratos ou doze horas após pode ser benéfica, para o controle da população de bactérias gram-positivas, produtoras de ácido láctico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Jassim R.A.M. & Andrews F. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Veterinary Clinics of North America: Equine Pract.*, 25:199-215, 2009.
- Cobea. Legislação & Ética. Disponível em: < <http://vsites.unb.br/ib/ceua/COBEA.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2008.
- Garner H.E., Moore J.N., Johnson J.H., Clark L., Amend J.F., Tritschler L.G., Coffman J.F., Sprouse R.F., Hutcheson D.P. & Salem C.A. Changes in the cecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, 10:249-252, 1978.
- Garner H.E., Hutcheson D.P., Coffman J.R. & Hahn A.W. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J. Ani. Sci.*, 45:1037-1041, 1977.
- Goodson J., Tyznik W.J., Cline J.H., & Dehority, B.A. Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1946-1950, 1988.
- Hoffman R.M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. *Rev. Bras. Zootec.*, 38(supl.):270-276, 2009.
- Julliard V., Fombelle A., Drogoul C. & Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: 3- Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J. Equine Vet. Sci.*, 22:543-546, 2001.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schuckenberg P.C. & Winn JR., W.C. Diagnóstico Microbiológico, 5ª ed. Medsi, Rio de Janeiro, 2001. p.437-445
- Krieg N. R. & Holt J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994. 754 p.
- Krouger A.S., Kinden D.A., Garner H.E. & Sprouse, R.F. Ultrastructural study of the equine cecum during onset of laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, 47:1804-1812, 1986.
- Lopes M.A.F., White II, N.A., de Lima L.R. & Costa P.R.S. Large Experimental Fistula of the Right Dorsal Colon in Horses. *J. Equine Vet. Sci.*, 30:213-219, 2010.
- Milnovich G.J., Trott D.J., Burrell P.C., Croser E.L., Al Jassim R.A.M., Morton J.M., Van Eps A.W. & Pollitt C. C. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ. Microbiol.*, 9:2090-2100, 2007.
- Milnovich G.J., Klieve A.V., Pollitt C.C. & Trott D.J. Microbial Events in the Hindgut During Carbohydrate-induced Equine Laminitis. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 26:79-94, 2010
- Moore J.N., Garner H.E., Berg J.N. & Sprouse R.F. Intracecal endotoxin and lactate during onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, 40:722-723, 1979.
- Pagan J.D. Carbohydrates in equine nutrition, p.57-70. In: Pagan J.D. (Ed.), *Advances in Equine Nutrition: Proc. Kentucky Equine Res. Nutr. Conf.* Nottingham University Press, Nottingham, 1998.
- Pollitt C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis, *Equine Vet. J.*, 28:38-46, 1996.
- Pollitt C.C. & Visser M.B. Carbohydrate Alimentary Overload Laminitis, p.65-78. In: Pollitt C.C. (Ed.), *Advances in Laminitis, Part I. Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 2010. 232p.
- Rowe J.B., Pethick D.W. & Johnson K.G. Controlling acidosis in equine hindgut. *Recent Adv. Ani. Nutr. Aust.*, 1995. 10:136-142.
- Weiss D.J., Geor R.J. & Johnston G. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 55:606-612, 1994.