

JOSÉ FRANCISCO GHIGNATTI WARTH

Aspectos Microbiológicos e Epidemiológicos da
Infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* em
Bovinos no Estado do Paraná, Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mes-
tre em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo do Nascimento Mós

São Paulo
1990

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Warth, José Francisco Ghignatti.

Aspectos microbiológicos e epidemiológicos da infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* em bovinos no Estado do Paraná - Brasil / José Francisco Ghignatti Warth. -- São Paulo, 1990.

Dissertação (mestrado)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Mós, Eduardo do Nascimento.

Descritores: 1.*Yersinia pseudotuberculosis* 2.Diarreia bovina 3.Fezes 4.Conteúdo gastrointestinal 5.Sorotipagem 6.Diarreia bovina, incidência

USP/ICB-SDI.001/90

"In Memoriam"
a minha irmã **Miriam Beatriz**
pela falta que faz na vida de
meus pais, de meus irmãos e
na minha.

À **Rejane**
companheira de tantas lutas e
sacrifícios.

Aos meus filhos
Anne, Marcos e Cintia
razão de tudo.

"In Memoriam"

Ao inesquecível
Dr. Evaldo Benedito de Oliveira
pelos seus ensinamentos, amizade sincera e os mesmos ideais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo-USP, pela oportunidade de estudar na maior e melhor Universidade do País.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas-ICB, por ter me possibilitado realizar o curso de Mestrado em Microbiologia, dando-me todas condições para isto.

À Secretaria da Agricultura do Estado do Paraná - SEAG e ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - CDME, pela liberação concedida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Dr. Eduardo do Nascimento Mós, pela paciente orientação, constante estímulo e amizade, demonstrada em todos os momentos de nosso convívio.

Ao colega Oswaldo Durival Rossi Junior, companheiro de curso e amigo sincero de todas as horas.

Ao Professor Dr. Sebastião Timo Iaria, pelas valiosas sugestões e por manter aos pós-graduandos, a porta do seu laboratório sempre aberta.

Aos Professores Claudete Rodrigues Paula, Benedito Corrêa, Walderez Gambale, Manuel Azevedo dos Santos, Roberto Yanaguita e Paulo Yassuda, pelo carinho sincero com que sempre me receberam.

À Professora Dra. Deise Passeto Falcão, pelos conselhos e sugestões, bem como pelos trabalhos de sorotipagens realizados no Centro Nacional de Referência de Yersinia.

Aos colegas e professores da Faculdade de Veterinária de Jaboticabal-UNESP, pelos momentos agradáveis passados juntos.

Ao colega Juan Pastor Herrera Carpio, esposa e filhos, por terem me acolhido em seu lar, num convívio fraterno.

Aos colegas Rosária Richartz, Luiz Francisco e Dalmir Martins, coordenadores do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pela confiança depositada na realização e conclusão deste curso.

Aos colegas de campo, pelo envio das amostras e pelo espírito de coleguismo com que trabalhamos juntos.

Às colegas Maria Luiza Leonardi Gonçalves, Maria Emilia Alcantara Klüppel, Sônia Maria Biesdorf e Sandra Barros, por terem me substituído nos trabalhos de laboratório, enquanto estudava.

Ao colega e amigo Juan Antonio Montano Hirose, pelas valiosas sugestões e envio paciente de importantes referências bibliográficas do Instituto Pasteur de Paris.

Às biólogas do Museu de História Natural, Vanessa Guerra Persson e Maria Lúcia Lorini, pelas identificações taxonómicas dos roedores capturados.

Ao colega Dr. David Emilio Santos Neves de Barcelos, pelas referências bibliográficas cedidas.

À Sra. Tereza Cristina Soutto Maior e a seus pais por terem me auxiliado muito e apoiado constantemente.

À Sra. Naide Farripas, secretaria do Curso de Pós Graduação pela competência demonstrada a todos os pós graduandos.

À Sra. Vicentina Palma dos Santos, pelo zelo e carinho para com meus filhos durante minha ausência de casa, permitindo-me estudar com tranquilidade.

E, finalmente, a todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuiram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. MATERIAL ANALISADO	36
3.2. MATERIAL DE LABORATÓRIO	36
3.3. METODOLOGIA EMPREGADA	46
4. RESULTADOS	59
4.1. COPROCULTURAS.....	59
4.2. CULTURAS DE CONTEÚDO DE INTESTINO DELGADO ...	59
4.3. CULTURAS DE CONTEÚDO DE INTESTINO GROSSO	59
4.4. PROVAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS E QUI- MIOTERÁPICOS	60
4.5. SOROTIPAGENS	60
4.6. PROVAS DE PATOGENICIDADE A COBAIOS	61
4.7. ISOLAMENTO DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> E SUA OCORRÊNCIA NOS MESES MAIS FRIOS DO ANO ..	62
4.8. POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE ROEDORES NA TRASMIS- SÃO DO MICRORGANISMO AOS BOVINOS	63
4.9. RESULTADOS OBTIDOS EM CULTURAS PRIMÁRIAS E SE- CUNDÁRIAS NO ISOLAMENTO DE <i>Yersinia pseudotu-</i> <i>berculosis</i>	64
4.10. MORBIDADES E MORTALIDADES BOVINAS ATRIBUÍDAS POSSIVELMENTE A INFECÇÃO PELA <i>Yersinia pseu-</i> <i>dotuberculosis</i> EM FAZENDAS NO ESTADO DO PARANÁ, DURANTE OS ANOS DE 1987 E 1988	65

5. DISCUSSÃO	102
5.1. FREQUÊNCIA DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> EM FEZES E CONTEÚDOS INTESTINAIS DE BOVINOS ACOMETIDOS DE DIARRÉIA	102
5.2. SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS	110
5.3. CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA DAS CEPAS DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	114
5.4. PATOGENICIDADE EXPERIMENTAL A COBAIOS	118
5.5. OCORRÊNCIA DOS CASOS DE DIARRÉIA BOVINA COM ISOLAMENTO DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> NOS MESSES MAIS FRIOS DO ANO	125
5.6. ENVOLVIMENTO DE ROEDORES NA TRANSMISSÃO DO MICOORGANISMO AOS BOVINOS	128
5.7. ISOLAMENTO DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> EM CULTURAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS	136
5.8. MORBIDADES E MORTALIDADES BOVINAS ATRIBUÍDAS POSSIVELMENTE A YERSINIOSE PSEUDOTUBERCULOSA NO ESTADO DO PARANÁ	140
6. CONCLUSÕES	146
7. SUMMARY	148
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Amostras de fezes e conteúdo intestinal, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , em relação ao total de amostras analisadas em casos de diarréia bovina, durante os anos de 1987 e 1988 (no Estado do Paraná)	66
2	Características de sensibilidade e resistência "in vitro" das 60 cepas de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> pertencentes ao sorogrupo O III, isoladas à partir de fezes e conteúdos intestinais de bovinos acometidos de diarréia	70
3	Resultados da sorotipagens das 25 cepas de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , isoladas durante o ano de 1987, fornecidos pelo Centro Nacional de Referência de <i>Yersinia</i>	71
4	Resultados das sorotipagens das 35 cepas de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , isoladas durante o ano de 1988, fornecidos pelo Centro Nacional de Referência de <i>Yersinia</i>	72
5	Frequência do isolamento de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , pertencente ao sorogrupo O III, de fezes de cobaios, em dias subsequentes à administração oral de suspensão do mesmo microrganismo, obtida a 4°C e a 28°C	74
6	Isolamento de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , pertencente ao sorogrupo O III, de órgãos de cobaios, pós óbito, posteriormente a administração oral de suspensões do mesmo microrganismo obtida a 4°C e a 28°C	75

7	Distribuição mensal das amostras bovinas, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> examinadas no laboratório durante o ano de 1987	76
8	Distribuição mensal das amostras bovinas, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , examinadas no laboratório durante o ano de 1988	77
9	Meses de ocorrência dos 22 isolamentos de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> em amostras bovinas, durante o ano de 1987 no Estado do Paraná	80
10	Meses de ocorrência dos 33 isolamentos de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> em amostras bovinas , durante o ano de 1988 no Estado do Paraná	82
11	Identificação taxonômica dos roedores capturados em fazendas dos municípios de Ivaiporã e Faxinal no Estado do Paraná	85
12	Isolamento de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> segundo a metodologia de isolamento empregada (Ano 1987)	86
13	Isolamento de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> segundo a metodologia de isolamento empregada (Ano 1988)	87
14	Prováveis percentuais de morbidade e mortalida de bovina atribuídos a infecção entérica pela <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , em 12 fazendas do Estado do Paraná durante o ano de 1987	90
15	Prováveis percentuais de morbidade e mortalida de bovina atribuídos a infecção entérica pela <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , em 19 fazendas do Estado do Paraná, durante o ano de 1988	91

16	Relação dos 21 municípios do Estado do Paraná que apresentaram animais positivos para <u><i>Yersinia pseudotuberculosis</i></u> e o número de focos por municípios nos anos de 1987 a 1988	92
----	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Número de amostras de fezes obtidas de bovinos acometidos de diarréia, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná	67
2 Número de amostras de conteúdos de Intestino Delgado obtidas de bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná	68
3 Número de amostras de conteúdos de Intestino Grosso, obtidas de bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, positivas e negativas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná ..	69
4 Distribuição mensal do número de casos de diarréia bovina positivos e negativos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> durante o ano de 1987 no Estado do Paraná	78
5 Distribuição mensal do número de casos de diarréia bovina positivos e negativos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> durante o ano de 1988 no Estado do Paraná	79
6 Percentuais de casos de diarréia positivos e negativos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> distribuídos nas estações do ano de 1987	81

7	Percentuais de casos de diarréia positivos e negativos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> distribuídos nas estações do ano de 1988	83
8	Percentuais acumulados de casos de diarréia positivos e negativos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , distribuídos nas estações dos anos de 1987 e 1988	84
9	Percentuais de isolamento de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> sorogrupo O III, obtidos nos cultivos primários e secundários com 7, 14 e 21 dias de incubação a 4°C	89
10	Localização geográfica dos 21 municípios do Estado do Paraná, que apresentaram animais positivos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	93
11	Aspecto geral dos animais acometidos de diarréia positivos para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	94
12	Aspecto de um animal acometido de diarréia positivo para o microrganismo. Notar o estado de depauperamento geral	94
13	Aspecto edemaciado e ulcerado da mucosa do abomaso (abomasite) de um bovino positivo para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	95
14	Aspecto das alças mesentéricas edemaciadas, apresentando petéquias na serosa bem como linfadenite	95
15	Aspecto edemaciado e hemorrágico da mucosa do intestino grosso de um bovino positivo para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	96
16	Aspecto edemaciado da mucosa do intestino delgado de um bovino positivo para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	96

17	Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de um bovino (infecção natural). Microabscesso envolvendo colónia de bactérias na mucosa. H.E. 40 X	97
18	Aspecto da mucosa gástrica de um cobaio inoculado com suspensão bacteriana de <i>Yersinia pseu</i> <i>cotuberculosis</i> . cultivada a 28ºC	98
19	Aspecto das alças intestinais de um cobaio inoculado com suspensão bacteriana do citado microrganismo cultivada a 28ºC. Notar o acúmulo de líquido no interior dos intestinos	98
20	Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de uma cobaia (<i>Cavia cobaya</i>). Infecção experimental 32 horas pós-inoculação oral. Colônias de bactérias envoltas por neutrófilos (microabcesso) na mucosa. H.E. 40 X	99
21	Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de uma cobaia (<i>Cavia cobaya</i>). Infecção experimental 32 horas pós-inoculação oral. Necrose e hemorragia na mucosa com acúmulo de fibrina, neutrófilos e colônias de bactérias na superfície. Hiperemia, discreta hemorragia e infiltração inflamatória mista na submucosa. H.E. 40 X.	100
22	Aspecto de cultura de fezes positivas para <i>Yen</i> <i>sinia pseusotuberculosis</i> no Agar Mac Conkey após 48 horas a 37ºC. Notar pequenas colônias lactose negativas entre as colônias lactose positivas	101
23	Aspecto do comportamento bioquímico da <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> no meio presuntivo de TSI e no I.A.L.	102

RESUMO

Com o objetivo de pesquisar a presença de *Yersinia pseudotuberculosis* associada a quadros clínicos de diarréia bovina no Estado do Paraná, foram analisadas durante os anos de 1987 e 1988 220 amostras de fezes, 60 conteúdos de intestino delgado e 56 conteúdos de intestino grosso, obtendo-se isolamento positivo em 46 (21%), 9(15%) e 5 (9%) das amostras respectivamente, totalizando 60 cepas do microrganismo.

As 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* pertenciam ao sorogrupo O III, apresentando idêntica sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos quando testados "in vitro".

Estatisticamente comprovou-se haver relação entre os isolamentos das cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* e os meses mais frios do ano.

Considerando as três faixas etárias estudadas (bezerros, novilhos e adultos), as taxas de morbidade situaram-se no ano de 1987 em 0%, 10,3% e 6,7% respectivamente e no ano seguinte em 0%, 13,4% e 11,7%. Em relação à mortalidade, estas situaram-se no ano de 1987 em 0%, 1,0% e 2,6% e 0%, 2,7% e 2,6% no ano de 1988.

A cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III mostrou-se patogênica aos cobaios, quando adminis-

trada via oral.

Apesar dos resultados bacteriológicos negativos, não se descartou a possibilidade do envolvimento de roedores silvestres e comensais na transmissão do microrganismo aos bovinos, podendo os próprios bovinos ou o solo, servirem como reservatórios do microrganismo.

A metodologia utilizada no isolamento das cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* possibilitou que 73,3% das mesmas fossem isoladas no cultivo primário e 26,66% após o crio enriquecimento na temperatura de 4°C por 7, 14 e 21 dias.

1. INTRODUÇÃO

As síndromes diarréicas nos animais, apesar de intensamente pesquisadas, apresentam muitos aspectos a serem esclarecidos.

Segundo TZIPORI (1981), as diarréias nos bovinos permanecem de longe incontroladas, devido a sua complexa etiologia, que envolve além dos agentes infecciosos, fatores imunológicos, nutricionais e de meio ambiente.

Dentre as principais doenças bacterianas causadoras de diarréia bovina, se destacam a Colibacilose neonatal, causada por cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ACRES, 1985) e a Salmonelose, causada principalmente pelos sorotipos *Salmonella dublin* e *Salmonella typhimurium* (GIBSON, 1961; EDWARDS & GALTON, 1967).

No Estado do Paraná, verifica-se desde 1982, surtos de diarréia bovina com altas taxas de morbidade e morte lidade, atingindo animais com idades superiores a um ano, de raças indianas em criações extensivas de gado de corte. Os exames bacteriológicos não apontavam para os enteropatógenos comumente encontrados nos casos de diarréia bovina, mas para um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, denominado *Yersinia pseudotuberculosis*, raramente isolado em

nosso país. O primeiro caso de isolamento de *Yersinia pseudo*
tuberculosis nos animais deste Estado, ocorreu no ano de
1982 em búfalos. Estes animais apresentavam diarréia aquosa
e intensa como característica principal (OLIVEIRA et alii,
1983). Nos anos seguintes ocorreram novos surtos diarréicos,
com isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis*, atingindo bo-
vinos em diversos municípios do Estado (WARTH et alii, 1984).
Tal ocorrência, tornou-se frequente causando sérios prejuí-
zos à pecuária.

Denomina-se de Yersiniose pseudotuberculosa a to
das as formas clínicas causadas pela *Yersinia pseudotuber-*
closis tanto no homem quanto nos outros animais (ACHA &
SZYFRES, 1986).

Segundo algumas das maiores autoridades no assun-
to, este microrganismo afeta todos os animais de uma maneira
geral, a exceção da espécie bovina e equina (MOLLARET et
alii, 1982).

Visando contribuir para um melhor esclarecimento
sobre a participação deste enteropatógeno na espécie bovina,
idealizou-se o presente trabalho que tem como objetivos
principais:

1. Rever extensivamente a literatura especializa-
da no assunto.
2. Pesquisar a presença de *Yersinia pseudotuber-*
closis em fezes de bovinos* com sintomatologia diarréica.
3. Pesquisar a presença de *Yersinia pseudotuber-*
closis em conteúdos intestinais de bovinos* que pereceram
com sintomatologia diarréica.

*Bovinos de corte e de leite.

4. Verificar a sensibilidade e resistência das possíveis cepas isoladas aos antibióticos e quimioterápicos.

5. Verificar os sorogrupos prevalentes em casos de diarréia bovina no Estado do Paraná.

6. Verificar a patogenicidade a cobaias dos possíveis sorogrupos de *Yersinia pseudotuberculosis* isolados.

7. Relacionar, se possível, os isolamentos de *Yer-*
sinia pseudotuberculosis e a sua ocorrência nos meses mais frios do ano.

8. Verificar o possível envolvimento de roedores na transmissão do microrganismo aos bovinos.

9. Analisar os resultados bacteriológicos obtidos em culturas primárias e secundárias no isolamento de *Yer-*
sinia pseudotuberculosis.

10. Verificar as prováveis taxas de mortalidade e morbidade bovina atribuídas a infecção pela *Yersinia pseudotu-*
berculosis nos rebanhos afetados pela síndrome diarréica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

"Isto foi para mim entre todas as maravilhas que descobri na natureza a mais maravilhosa de todas; preciso dizer que, para mim, vi-são mais agradável jamais veio a meus olhos que aquelas milhares de criaturas viventes, vistas na ma gotinha de água..."

Anton van Leeuwenhoek

A denominação *Yersinia* foi dada em homenagem ao bacteriologista francês Alexandre Yersin, que primeiro isolou o microrganismo causador da Peste Bubônica em 1894. A criação deste novo gênero foi atribuída a Van Loghem em 1944 e tinha como objetivo separar as bactérias que possuam características distintas das do gênero *Pasteurella* (MOLLARET, 1966). Anteriormente a Alexandre Yersin, Malassez e Vignal, tiveram o primeiro contato com o microrganismo hoje classificado como *Yersinia pseudotuberculosis* (MOLLARET et alii, 1982).

SMITH & THAL (1965), estudando 25 amostras bacterianas classificadas inicialmente como pertencentes ao gêne-

ro *Pasteurella* pelo Método Adansoniano, verificaram que elas poderiam ser divididas em dois grupos. As amostras oxidase negativas, abrangendo as espécies *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Pasteurella pestis* e *Pseudotuberculosis "X"* e as amostras oxidase positivas, abrangendo as demais espécies do gênero.

Em 1972 o Sub-comitê para *Yersinia*, *Pasteurella* e *Francisella* que faz parte do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, determinou a inclusão do gênero *Yersinia* na família *Enterobacteriaceae* e este, abrangendo as espécies *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* (THAL, 1974).

A família *Enterobacteriaceae*, segundo a 8^a edição do Manual de Bergey editada em 1974, está dividida em cinco tribos: *Eschirichiaeae*, *Klebsielleae*, *Proteaeae*, *Erwiniaeae* e *Yersiniiaeae*. O XI gênero *Yersinia* está dividido em três espécies: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* (MOLLARET & THAL, 1974).

Na 9^a edição do Manual de Bergey editada em 1984, o gênero passou para o XIV lugar e recebeu além das três espécies citadas na edição anterior, a inclusão de mais quatro espécies: *Yersinia intermedia*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia ruckeri* e *Yersinia kristensenii* (BERCOVIER & MOLLARET, 1984).

O microrganismo hoje classificado como *Yersinia pseudotuberculosis* recebeu pela primeira vez a designação de "bacilo da tuberculose zoogléica" por Malassez e Vignal em 1883, ao observarem o que lhes pareceram lesões tuberculosas em cobaio inoculado com material purulento de uma criança que havia morrido de uma aparente meningite tuberculosa

(MAIR, 1975; MOLLARET et alii, 1982). Segundo MOLLARET (1965), desde então, esse microrganismo tem recebido diferentes denominações por diversos pesquisadores em diferentes épocas. Cronologicamente, recebeu a denominação de *Streptobacillo* por Dor em 1888; *Bacillus psudotuberculosis* por Pfeiffer em 1889 e por Eisenberg em 1891; *Strepto-bacillus pseudotuberculosis rodentium* por Preisz em 1894; *Bacterium pseudotuberculosis rodentium* por Lehmann e Neumann em 1896; *Bacterium pseudotuberculosis* por Migula em 1900; *Bacillus intestinalis caviae* por Byloff em 1906; *Bacillus pseudopestis* por Pribram e Plasaj em 1921; *Corynebacterium rodentium* por Bergey et alii em 1923; *Corynebacterium pseudotuberculosis* por Bergey et alii em 1925; *Corynebacterium pseudotuberculosis rodentium* por Kelser em 1933; *Shigella pseudotuberculosis* por Haupt em 1935; *Pasteurella pseudotuberculosis* por Topley e Wilson em 1936; *Yersinia rodentium* por Van Loghem em 1944-45; *Cillopasteurella pseudotuberculosis* por Prevost em 1948; *Yersinia pseudotuberculosis* por Smith e Thal em 1965.

Quanto a morfologia, *Yersinia pseudotuberculosis* apresenta-se como um pequeno bacilo Gram negativo, semelhante às demais enterobactérias, medindo 0,8 x 2,0 microns, não esporulado, não capsulado, pleomórfico, apresentando-se como coco bacilo, forma bacilar isolada ou em cadeias curtas. Geralmente móvel, devido aos flagelos peritriquios quando cultivado a temperaturas inferiores a 30°C, apresenta-se imóvel quando cultivado a 37°C (MOLLARET et alii, 1982).

Quanto a cultura em meios sólidos, *Yersinia pseudotuberculosis* cresce sobre meios sólidos comuns como gelose nutritiva ou extrato de carne. Nestes, após 24 horas de incubação a 30°C ou a 37°C, desenvolvem-se colônias translúcidas

de 1,5 mm de diâmetro, lisas, com bordos arredondados. Após 48 horas, o diâmetro atinge 3 mm, apresentando o centro colonial mais opaco e elevado com típico formato de um chapéu chinês. Já sobre os meios enriquecidos como gelose com soro ou com sangue, as colônias tornam-se apenas um pouco maiores. No meio de agar sangue não apresenta capacidade hemolítica. Dependendo dos meios utilizados as culturas de *Yersinia pseudotuberculosis* dissociam-se em colônias pequenas e grandes. Sobre os meios seletivos com sais biliares, resiste a concentração de desoxycolato entre 1,5 a 7 gramas por litro (MOLLARET et alii, 1982). Ainda no que se refere ao tamanho colonial, segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), os membros do gênero *Yersinia* diferenciam-se de todas as demais enterobactérias por apresentarem menor diâmetro.

Quanto a cultura em meios líquidos como água de peptona ou caldo simples, *Yersinia pseudotuberculosis* desenvolve-se após 24 horas de forma abundante. Pode ser cultivada em temperaturas entre 4°C e 42°C, num pH entre 5 e 9,6 e numa concentração de NaCl de 0 a 3,5%. As condições ótimas de crescimento situam-se a 30°C e pH de 7,2 (MOLLARET et alii, 1982).

Quanto ao metabolismo, *Yersinia pseudotuberculosis* apresenta-se como um microrganismo anaeróbico facultativo, possuindo vias de metabolismo intermediário comparáveis ao das outras enterobactérias (MOLLARET et alii, 1982).

Quanto aos caracteres bioquímicos, a *Yersinia pseudotuberculosis* não produz gás a partir das fermentações de açúcares, apresentando grande homogeneidade bioquímica. Somente aquelas pertencentes ao sorogrupo O IV, diferenciam-se das outras pela utilização do Citrato de Simmons e do Malonato. A

atividade ureásica é intensa e rápida, tornando-se positiva em 5 a 10 minutos (MOLLARET et alii, 1982).

Segundo BERVOVIER & MOLLARET (1984), *Yersinia pseudotuberculosis* apresenta as seguintes reações bioquímicas:

Características	Resultado
Motilidade (25°C)	+
Lisina descarboxilase (Moller)	-
Ornitina descarboxilase (Moller)	-
Urease	+
β-Xylosidase	+
Gelatinase	-
Citrato (Simmons), 25°C	-*
Voges-Porskauer, 25°C	-
Produção de Indol	-
Glutamil transferase	d
Produção de ácido a partir de:	
Rhamnose	+
Sacarose	-
Cellulose	-
Melibiose	+
α-Metil-Glicosídeo	-
Sorbose	-
Sorbitol	-
Rafinose	d
Catalase	+
Oxidase	-
Formação de pigmento	-

*Cepas pertencentes ao sorogrupo O IV são positivas.
Observação: Os testes acima descritos foram realizados na temperatura de 28°C durante 72 horas, exceto quando indicados.

Características	Resultado
Motilidade, 37°C	-
Teste do Vermelho de Metila, 37°C	+
Teste de Voges-Porskauer, 37°C	-
Citrato (Simmons), 37°C	-
Crescimento em KCN, 37°C	-
Utilização do Malonato	-*
Utilização do D-Tartarato	-
Utilização do Mucato	-
Citrato (Christensen)	+
Redução de Nitrato e Nitrito	+
Teste de Oxidação-Fermentação (Hugh-Leifson)	0/F
Produção de gás a partir da D-glicose	-
Produção de H ₂ S (Kliger)	-
Tetrathionato redutase	d
Fenilalanina ou Triptofano desaminase	-
Arginina dihidrolase (Moller)	-
β-Galactosidase	+
Lipase (Tween 80)	-
Desoxirribonuclease	d
L-Arabinose	+
Glicerol	+
Inositol	-
D-Xilose	+
Esculina	-
Amidalina	-
Arbutin	d

* Cepas pertencentes ao sorogrupo OIV são positivas.

Observação: Os testes acima descritos foram realizados na temperatura de 28°C durante 72 horas, exceto quando indicados.

Características	Resultados
Salicina, dextrina	d
Lactose	-
Adonitol, eritritol, dulcitol, D-arabinose, L-xylose, Metil-D-manoside, Methyl-xyloside, Melezitose, inulina	-
Produção de ácido à partir de:	
Glicose, frutose, galactose, ribose, manose, maltose, trealose, manitol, N-acetylglucosamina	+

Quanto a classificação sorológica da *Yersinia pseudotuberculosis*, o esquema antigenico proposto por THAL & KNAPP (1971), é citado na 9ª edição do Manual de Bergey de 1984. Compõem-se os抗ígenos somáticos de seis sorogrupos, identificados através de algarismos romanos de I a VI (antígenos O, de constituição lipopolissacarídica, termoestáveis). Os sorogrupos OI, OII, OIV e OV, estão divididos em dois sub-grupos A e B. Estes抗ígenos somáticos são representados pelos algarismos arábicos de 2 a 15, sendo estes fatores, específicos aos sorogrupos e sub-grupos. Os抗ígenos flagelares por sua vez, (antígenos H, de constituição proteica, termolábeis), são em número de cinco, identificados através das letras minúsculas do alfabeto (a,b,c,d,e).

Na Tabela a seguir, o esquema proposto pelos autores citados:

Estrutura antigenica da *Yersinia pseudotuberculosis* segundo THAL & KNAPP (1971).

Grupo	Sub-Grupo	Antígeno R	Antígenos O	Antígenos H
I	A	(1)	2, 3	a, c
	B	(1)	2, 4	a, c
II	A	(1)	5, 6	a, d
	B	(1)	5, 7	a, d
III	-	(1)	8	a
	A	(1)	9, 11	b; a, b
IV	B	(1)	9, 12	a, b, d
	A	(1)	10, 14	a; a, e(b)
V	B	(1)	10, 15	a
VI	-	(1)	13	a

Quanto ao diagnóstico bacteriológico, o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* é fácil nos meios usuais a partir do sangue, de linfonodos mesentéricos ou de um microabscesso, porém delicado a partir de fezes, habitualmente pobres deste microrganismo (MOLLARET et alii, 1982).

Na escolha dos meios de cultura apropriados para o isolamento da *Yersinia pseudotuberculosis*, o uso do Agar Sangue é recomendado por MARTIN & WASHINGTON (1980) e BERCOVIER & MOLLARET (1984). A utilização deste meio na rotina bacteriológica de isolamento de enterobactérias de uma maneira geral também é recomendada por EDWARDS & EWING (1972), junto com os meios considerados de baixa, média e alta seletividade, conforme o microrganismo que se deseja isolar. A utilização do Agar MacConkey, considerado de baixa seletividade

para enterobactérias por EDWARDS & EWING (1972), é o meio indicado para o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* segundo FALCÃO (1976); TSUBOKURA et alii (1976); FALCÃO et alii (1979); MARTIN & WASHINGTON (1980) e BERCOVIER & MOLARET (1984). Segundo FALCÃO (1976), num trabalho de rotina diagnóstica voltada para *Yersinia pseudotuberculosis* os melhores meios de cultura para o seu isolamento são o Agar MacConkey seguido do Agar SS, na temperatura de incubação entre 35-37°C por um período de 48 horas.

Quanto ao uso de crioenriquecimento no isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis*, VAN NOYEN et alii (1980) citam que PATERSON & COOK (1963) foram os primeiros a utilizá-lo, a semelhança da técnica já usada para o isolamento de bactérias do gênero *Listeria* sp. Verificaram os autores citados que havia um incremento no número de microrganismos viáveis após 28 dias de incubação na temperatura de 3-4°C. Contagens iniciais de $9,0 \times 10^3$ U.F.C. passaram para $9,2 \times 10^9$ U.F.C. após este período. Desde então esta técnica tem sido utilizada não somente para a espécie citada, mas também para o isolamento de outras espécies do gênero *Yersinia* (EISS, 1975; RICCIARDI et alii, 1978; OBERHOFFER & PADGORE, 1980; VAN NOYEN et alii, 1980; WEISSFELD & SONNENWIRTH, 1980). A maior desvantagem no uso da técnica do crioenriquecimento é justamente o tempo necessário para o crescimento, que situa-se numa média de 21 dias, tempo este considerado demasiadamente longo em casos clínicos que exigem urgência no diagnóstico (WEISSFELD & SONNENWIRTH, 1980). Outros pesquisadores acreditam que em casos clínicos de Yersinioses, não há necessidade do uso da técnica do crioenriquecimento, já que o seu uso pode levar ao isolamento de sorotipos de *Yer-*

sinia sp. considerados não patogênicos, sem ligação com o quadro clínico e que só se desenvolveram, graças a suas características psicrófilas (VAN NOYEN et alii, 1980). Outros, ao invés da utilização do crioenriquecimento, utilizaram a técnica do uso de soluções alcalinas fracas, por ser mais rápidas, simples e sensível (ALUISIO et alii, 1980).

Já o diagnóstico sorológico é efetuado utilizando-se como抗ígenos, suspensões vivas do germe. Apresenta fidelidade, com exceção das reações cruzadas entre os soro-grupos I II e I IV de *Yersinia pseudotuberculosis* e membros do gênero *Salmonella* pertencentes ao grupo B e D, respectivamente. Os anticorpos humorais estão presentes já nas primeiras manifestações clínicas, levando-se em consideração títulos superiores ou iguais a 1:200. Os títulos atingem um máximo de 1:1000 - 1:2000 uma a duas semanas mais tarde e desaparecem após dois a três meses. Intradermo-reações estão presentes ao mesmo tempo do surgimento dos anticorpos humorais e persistem uma dezena de anos ou mais (WINBLAD, 1976, MOLLARET et alii, 1982).

Quanto aos aspectos relacionados aos mecanismos de virulência apresentados pela *Yersinia pseudotuberculosis*, verifica-se que os mesmos estão intimamente relacionados com os apresentados pela *Yersinia pestis*. Segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), os citados microrganismos compartilham pelo menos de dois fatores de virulência em comum: o antígeno de envelope F1 e os antígenos V e W. As cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* tornam-se rapidamente avirulentas quando cultivadas a 37°C, devido a perda do plasmídeo de virulência responsável pela produção dos antígenos V e W e pela Cálcio dependência. Citam ainda, que algumas amostras de *Yersinia*

pseudotuberculosis pertencentes ao sorogrupo O III em sua grande maioria produzem uma exotoxina de atividade não bem definida.

Segundo WETZLER (1972), o maior fator de virulência apresentado pela *Yersinia pseudotuberculosis* são os antígenos V e W, denominados também de antígenos de Burrows e Bacon e que seriam os responsáveis pelas síndromes hemorrágicas agudas, rapidamente fatais que se observam principalmente em roedores ou lagomorfos. Estes antígenos V e W segundo o autor, presentes em abundância nos isolamentos primários de cepas altamente virulentas, deixam de ser produzidos quando o microrganismo é cultivado a 37°C, com a consequente perda da virulência.

Segundo GEMSKI et alii (1980 b), estes antígenos V e W são de constituição proteica-lipoproteica e embora a precisa importância ou responsabilidade deste complexo na patogenese seja ainda obscura, possibilita ao patógeno a sua multiplicação no interior dos macrófagos.

De uma maneira geral, os testes de avaliação "in vitro" da virulência da *Yersinia pseudotuberculosis* bem como de outras espécies do gênero recentemente utilizados são os seguintes:

- . Biossíntese dos antígenos V e W (LAWTON et alii, 1960; LAWTON et alii, 1963; CARTER et alii, 1980; GEMSKI et alii, 1980 b).
- . Cálcio Dependência (LAWTON et alii, 1963; DOYLE et alii, 1982; KAY et alii, 1983; BOLIN & WOLF-WATZ, 1984; HEESEMANN et alii, 1984; PRPIC et alii, 1985).
- . Autoaglutinação (LAIRD & CAVANAUGH, 1980; KAY et alii, 1983; KAPPERUD & LASSEN, 1983; KAPPERUD et alii, 1985; PRPIC et

- alii, 1985).
- . Absorção de Hemin-Pigmentação Colonial (JACKSON & BURROWS, 1956; PRPIC et alii, 1983; PRPIC et alii, 1985 e ROBINS-BROWN & PRPIC, 1985).
 - . Hidrofobicidade (PRPIC et alii, 1985).
 - . Isolamento e caracterização de Plasmídeos (GEMSKI et alii, 1980a; GEMSKI et alii, 1980b; PORTNOY & FALKOW, 1981; FERBER & BRUBAKER, 1981; BOLIN et alii, 1982; KAY et alii, 1982; PRPIC et alii, 1983 e PRPIC et alii, 1985).
 - . Morfologia Colonial-temperatura Dependente (KAY et alii, 1983; CHANG et alii, 1984).
 - . Resistência ao Soro Normal (PAI & DESTEPHANO, 1982; PRPIC et alii, 1983 e PRPIC et alii, 1985).
 - . Produção de Proteínas de Membrana Externa e Auxiliares - OMPs (BOLIN et alii, 1982; BOLIN & WOLF-WATZ, 1984; KAPPE-TUD et alii, 1985).
 - . Invasibilidade e Aderência em Cultivos Celulares (BOLIN et alii, 1982; PAI & DESTEPHANO, 1982; KAY et alii, 1983; HESEMAN et alii, 1984).
 - . Efeito Tóxico em Cultivo Celulares (KAY et alii, 1983).
 - . Produção de Fimbrias Temperatura-Dependentes (MACLAGAN & OLD, 1980).
 - . Produção de Enterotoxinas (PAI & MORS, 1978; KAPPERUD, 1980; GEMSKI et alii, 1980b; NUNES & RICCIARDI, 1981; OKAMOTO et alii, 1981; PAI & DESTEPHANO, 1982; KAY et alii, 1983).
 - . Hemaglutinação (MACLAGAN & OLD, 1980; KAPPERUD & LASSEN, 1983; KAPPERUD et alii, 1985).

São também realizados testes de avaliação da virulência de *Yersinia pseudotuberculosis* e demais espécies do gênero, utilizando-se animais de laboratório como camun-

dongos neonatos, camundongos adultos, cobaias, coelhos, etc...

Nos experimentos com estes animais são utilizadas as vias oral, sub-cutânea, intraperitoneal, intragástrica, intra-intestinal, conjuntival, endovenosa, aerogênica, etc... (CARTER, 1975; PAI & MORS, 1978; RICCIARDI et alii, 1978; MAIR et alii, 1979; GEMSKI et alii, 1980b; LAIRD & CAVANAUGH, 1980; KAPPERUD, 1980; NUNES & RICCIARDI, 1981; OKAMOTO et alii, 1981; PAI & DESTEPHANO, 1982; CHANG et alii, 1984; TSUBOKURA et alii, 1984).

TSUBOKURA et alii (1984), para avaliar a virulência das amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*, utilizaram camundongos adultos inoculados pela via intraperitoneal. Com base nos resultados, obtiveram três grupos de cepas que apresentaram diferentes graus de virulência. O primeiro, e mais virulento, matou os camundongos provocando lesões internas. O segundo não matou os camundongos, mas provocou lesões macroscópicas nos órgãos internos e o terceiro grupo não matou nem provocou lesões internas.

PRPIC et alii (1983) e PRPIC et alii (1985), na avaliação da virulência, utilizaram camundongos BALB/c, inoculados pela via intraperitoneal (Teste de letalidade) e cobaias inoculados no saco conjuntival na avaliação de capacidade invasora das cepas (Teste de invasibilidade).

CHANG et alii (1984), avaliaram o grau de virulência pela capacidade das cepas de provocar a morte ou diarréia em camundongos.

BOLIN et alii (1982) e BOLIN & WOLF-WATZ (1984), utilizaram camundongos albinos suíços, inoculados pela via oral.

CARTER & COLLINS (1974), usando camundongos, uti-

lizaram as vias oral (intragastrica), intraperitoneal e aerogênica nos experimentos com *Yersinia* sp., observando que o desenvolvimento de uma infecção entérica é dose-dependente.

MAIR et alii (1979), utilizaram cobaios inoculados via intraperitoneal.

Segundo MOLLARET et alii (1982), a reprodução experimental da doença pode ser realizada por ingestões repetidas de suspensões bacterianas, já que a ingestão de uma única dose leva geralmente a um estado de portador transitório. Após 15 dias em média, aparece a diarréia, emagrecimento e morte. À necropsia, revela adenites mesentéricas abscedadas e microabscessos branco-grizaceos no fígado, baço e às vezes nos rins e pulmões. A instilação conjuntival provoca uma conjuntivite purulenta que sarà espontaneamente e confere proteção sólida contra uma segunda injeção, mesmo que esta seja por via intraperitoneal. Já a inoculação sub-cutânea em cobaios provoca a formação de um abscesso localizado, com ou sem fistulação, que evolui para a cura, sem ocasionar uma generalização do processo.

Denomina-se de Yersiniose a zoonose causada pela *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* (HUBBERT, 1972; MAIR, 1975; OBWOLE, 1976a; ACHA & SZYFRES, 1977).

As manifestações clínicas desta infecção no homem por ambos microrganismos são similares e ocorrem sob as formas clínicas de uma linfadenite mesentérica aguda, eritema nodoso, artrites, septicemias e enterites (MAIR, 1975; BERCOVIER & MOLLARET, 1984).

Porém, denomina-se de Yersiniose pseudotuberculo-sa a zoonose causada especificamente pela *Yersinia pseudotuberculosis* (ACHA & SZYFRES, 1986).

No que diz respeito às fontes de infecção e transmissão da Yersiniose pseudotuberculosa, ACHA & SZYFRES (1977), apontam com principal reservatório deste microrganismo na natureza os roedores. Estes animais segundo os autores, se infectam e eliminam o agente pela urina e fezes e à necropsia não se encontram lesões. Os lagomorfos e as aves servem como hóspedes amplificadores da infecção. Porém os mesmos autores na II^a edição do livro "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales", ampliaram as possibilidades no que diz respeito a fontes de infecção e modos de transmissão. Segundo ACHA & SZYFRES (1986), na epidemiologia desta Yersiniose existem ainda muitos aspectos a elucidar e a enorme gama de espécies de animais e aves que são naturalmente susceptíveis a infecção, faz supor que os animais de uma maneira geral, constituem-se no principal reservatório do agente etiológico. Outros pesquisadores acreditam que seja o solo o principal reservatório. O isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O II do solo e águas no Extremo Oriente da União Soviética, parece reforçar esta hipótese. Porém, segundo os autores, nada impede que tanto a água como o solo tenham sido contaminados a partir de fezes de animais. O modo de transmissão do agente é fecal-oral e a localização da infecção nos linfonodos mesentéricos indicaria que a via digestiva é a porta principal de penetração da bactéria.

Segundo MOLLARET et alii (1982) e BERCOVIER & MOLLARET (1984), tanto o homem como os animais se infectam com *Yersinia pseudotuberculosis* pela via oral, através do contato direto com animais doentes, portadores assintomáticos, através de alimentos contaminados pela excretas des-

tes animais e pelos reservatórios telúricos.

Infecções pelas vias conjuntivais e pulmonares têm sido descritas mas são excepcionais (MAIR, 1975; MOLLARET et alii, 1982).

Infecções latentes podem-se tornar manifestas sob condições de stress, tais como as que existem nos meses de inverno, quando os animais, principalmente os de vida livre são expostos ao frio e a fome (MAIR, 1973). A incidência desta doença infecciosa varia conforme as estações do ano, sendo mais alta durante as mais frias (MAIR, 1975; BERCOVIER & MOLLARET, 1984). Esta maior incidência nos meses mais frios do ano, também se explicaria, segundo BERCOVIER & MOLLARET, (1984), pelo fato de que mesmo na temperatura de 4°C, *Yersinia pseudotuberculosis* se multiplicaria, o que seria considerado uma vantagem sobre as outras bactérias.

Segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), *Yersinia pseudotuberculosis* é responsável por epizootias em quase todas as espécies animais, principalmente em roedores. Os animais são normalmente contaminados pela via oral e após uma semana ou duas de incubação, o microrganismo já é encontrado nos linfonodos mesentéricos. Os principais sintomas são de uma adenite mesentérica e diarréia crônica. A infecção encaminha-se à autocura ou à septicemia fatal. O microorganismo é um parasita intracelular e à necrópsia lesões são encontradas nas placas de Peyer, nos linfonodos mesentéricos, no baço e no fígado.

A doença, segundo MAIR (1975), pode ocorrer nas formas sub-aguda, aguda e crônica. Infelizmente não há sinais definitivos pelos quais a Yersiniose pseudotuberculosa possa ser reconhecida, principalmente nos casos isolados.

Os animais portadores de *Yersinia pseudotuberculosis* que permanecem na criação, podem perpetuar a infecção e originar novos surtos.

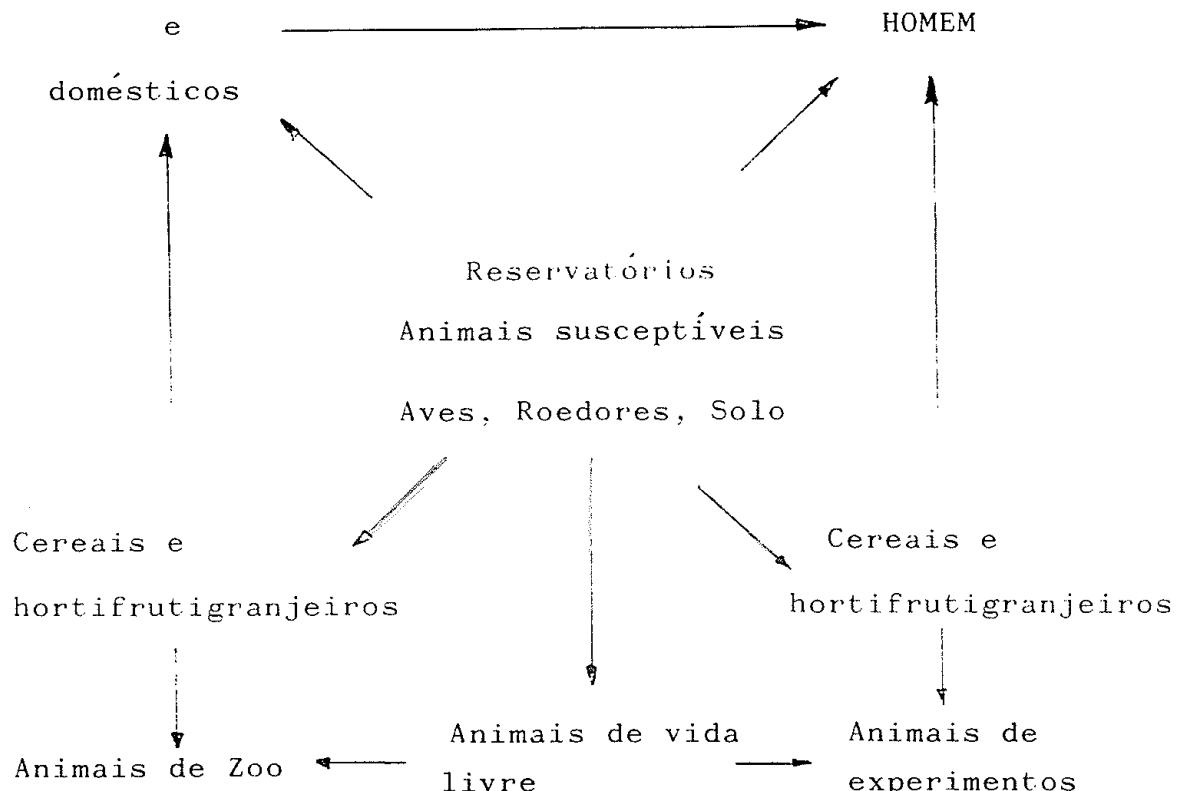
Na Europa Ocidental lebres e cobaios são os animais mais frequentemente afetados. Na França, Alemanha e Suíça, *Yersinia pseudotuberculosis* é a maior responsável pela morte de leporídeos do que qualquer outra causa bacteriana, tendo sido isolada em 60% dos casos em algumas áreas (MOLLARET et alii, 1982).

Segundo ACHA & SZYFRES (1986), na Europa tem sido descritas epizootias devastadoras em lebres. Também epizootias têm sido descritas em cobaios, aves silvestres, patos, pavões, pombos e canários.

De uma maneira geral, todas as espécies animais podem ser afetadas (a exceção do cavalo e dos bovinos), sob a forma de casos isolados ou epizootias invernais (MOLLARET et alii, 1982).

Modo provável de transmissão da Yersiniose pseudotuberculosa, segundo ACHA & SZYFRES (1986):

Animais de criação



Quanto ao aspecto da persistência ou viabilidade da *Yersinia pseudotuberculosis* no meio ambiente externo, observações de PATERSON & COOK (1963) demonstraram que quando a temperatura ambiente não ultrapassa os 5°C, o citado microrganismo sobrevive em depósitos fecais sobre as plantas por muitos dias. Segundo ACHA & SZYFRES (1986), *Yersinia pseudotuberculosis* pode sobreviver por longo tempo tanto no solo quanto na água. Segundo MOLLARET (1963), numerosos pesquisadores tem reportado o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* do solo, água, ar, esterco, forragens e leite. Segundo o autor, recentes estudos tem demonstrado que a mesma é altamente resistente a condições que seriam consideradas adversas para a maioria das bactérias, sobrevivendo no solo es-

terilizado por 18 meses e no solo não esterilizado por 11 meses.

A doença tem sido descrita em mamíferos domésticos e silvestres, aves domésticas e silvestres bem como em répteis (ACHA & SZYFRES, 1986).

Especificamente, quanto a ocorrência de *Yersinia pseudotuberculosis* nos animais silvestres, alguns trabalhos foram publicados na forma de revisão por MOLLARET (1961), WETZLER & HUBBERT (1968), HUBBERT (1972), LANGFORD (1972a), OBWOLO (1976a), OBWOLO (1976b), BORST et alii (1977), BUHLES et alii (1981).

Em roedores silvestres (LANGFORD, 1972a; HOFER et alii, 1979; BUHLES, 1981).

Em cervos (HENDERSON, 1983; HENDERSON & HEMMINGSEN, 1983; HODGES & CARMAN, 1984).

Em ratos (SCHNEIDER, 1968; ZEN-YOJI et alii, 1974).

Em chinchillas (HUBBERT, 1972; LANGFORD, 1972a; TRENCHI et alii, 1978).

Em lebres (MOLLARET, 1968; SCHNEIDER, 1968; LANGFORD, 1972a; MAIR, 1973).

Em leões, (TASLER et alii, 1979).

Em coelhos (SCHNEIDER, 1968; HUBBERT, 1972).

Em cobaios (SAUTU Riestra, 1930; QUEVEDO, 1934; ECHEIQUE & SOSA DE CARUSO, 1959; PATERSON & COOK, 1963; SCHNEIDER, 1968; HUBBERT, 1972; LANGFORD, 1972; WETZLER, 1972; MAIR et alii, 1975; RUSSEL & SCHILLING, 1976; FUROWICZ et alii, 1978; MOLLARET et alii, 1982; ROJAS et alii, 1982; NOSEDA et alii, 1987; PERFUMO et alii, 1987).

Em cães (YANAGAWA et alii, 1978).

Em gatos (SCHNEIDER, 1968; MAIR, 1975; O'SULLIVAN et alii, 1976; OBWOLO & GRUFFYDD-JONES, 1977; YANAGAWA

et alii, 1978; ALLARD, 1979).

Em macacos (BUHLES, 1981).

Em equídeos (MONTEVERDE & ROLDAN BONADEO, 1954; MAIR & ZIFFO, 1974).

Em suínos (HUBBERT, 1972; LANGFORD, 1972a; ZEN-YO JI et alii, 1974; TSUBOKURA et alii, 1976; BLACKALL, 1977; MAIR et alii (1979); BARCELLOS et alii, 1980; BARCELLOS et alii, 1981; WEBER & LEMBKE, 1981).

Em caprinos (MOLLARET & PLACIDI, 1964; SCHNEIDER, 1968; HUBBERT, 1972; CAPUCCI et alii, 1978; JONES, 1982).

Em ovinos (JAMIESON & SOLTYS, 1947; WATSON & HUNTER, 1960; MOLLARET & PLACIDI, 1964; MORIN & GSTACH, 1967 ; HUBBERT, 1972; KARBE & ERICKSON, 1984).

No que se refere a ocorrência de *Yersinia pseudotuberculosis* em bovinos, poucos são os casos citados na literatura veterinária especializada. MOLLARET (1961) afirmava, baseado na literatura consultada de que até então não havia comprovação (com certeza) de sua ocorrência na espécie bovina.

Segundo MOLLARET & PLACIDI (1964), em obras de re nome como "Traité de Microbiologie" e "Microbiologie Vétérinaire", os herbívoros em geral, são considerados refratários à infecção por *Yersinia pseudotuberculosis*.

MOLLARET (1968), citou que na França, *Yersinia pseudotuberculosis* jamais foi isolada de bovinos nem de cães, apesar de dois jumentos terem apresentado títulos aglutinantes de 1:200 e 1:500.

O mesmo autor, juntamente com colaboradores, reafirmam posteriormente, que a doença no mundo ocorre nos herbívoros de uma maneira geral, à exceção dos bovinos e do cão.

valo (MOLLARET et alii, 1982).

Em trabalho de revisão sobre a ocorrência de *Yersinia pseudotuberculosis* nos animais domésticos e silvestres, ROJAS et alii (1985), não incluem os bovinos como animais susceptíveis à infecção pelo microrganismo citado.

Porém, anteriormente, também em trabalho de revisão, OBWOLO (1976b) cita duas referências do microrganismo na espécie bovina. Ambas referências são citadas e analisadas individualmente em maior profundidade, posteriormente.

Por terem metodologias de isolamento semelhantes (MOLLARET et alii, 1982), em muitos trabalhos envolvendo bovinos, foram pesquisados concomitantemente tanto *Yersinia pseudotuberculosis* quanto *Yersinia enterocolitica* (ZEN-YOJI et alii, 1974; FUROWICZ et alii, 1975; CABASSI et alii, 1976; FUROWICZ et alii, 1977; BATRA (1979) apud BEHRA et alii (1984); WEBER & LEMBKE, 1981; WARTH et alii, 1984; FERREIRA et alii, 1985).

Outros pesquisadores, procurando avaliar especificamente a presença de *Yersinia enterocolitica* na espécie bovina (AHVONEN et alii, 1973; ESSEVELD & GOUDZWAARD, 1973; INOUE & KUROSE, 1975; LEISTNER et alii, 1975; HUGHES, 1979; WOOLEY et alii, 1980; HAWARI et alii, 1981; ZAMORA et alii, 1981; QUARTO et alii, 1982; DAVEY et alii, 1983; FUKUSHIMA et alii, 1983; BREWER & CORBEL, 1983; FEINHAKEN et alii, 1984; PANEBIANCO et alii, 1984), isolaram *Yersinia pseudotuberculosis* (BREWER & CORBEL, 1983; FUKUSHIMA et alii, 1983), ou outras espécies do gênero (FUKUSHIMA et alii, 1983; DAVEY et alii, 1983).

Na análise individual de cada trabalho publicado relacionando *Yersinia pseudotuberculosis* à espécie bovina encontramos as seguintes referências.

Na Argentina, QUEVEDO (1934) isolou o *Bacilo pseudotuberculosis rodentium* dos órgãos de um cobaio que havia sido previamente inoculado com uma suspensão de fragmentos de baço e estômago de um feto bovino abortado, cuja mãe apresentava aglutininas contra *Brucella abortus*. O cobaio morreu no quarto dia da inoculação intraperitoneal, apresentando à necropsia, lesões de uma peritonite fibrinosa.

No mesmo país, FUROWICZ et alii (1975), objetivando o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*, examinaram o fígado e baço provenientes de 5 terneiros, 24 vacas, 15 ovelhas, 1 suíno, 14 galinhas, 9 nutrias e 4 coelhos, perfazendo um total de 72 animais. Não lograram êxito no isolamento dos citados microrganismos.

Também na Argentina, FUROWICZ et alii (1977), seguindo a mesma linha anterior de pesquisa, examinaram materiais procedentes de 337 animais de diversas espécies. Entre estas amostras haviam 27 fígados e baços de bezerros além de 23 fetos bovinos. Também nesta pesquisa não houve isolamento dos citados microrganismos.

No mesmo país, PUEYO et alii (1987), realizaram uma pesquisa em 85 novilhos, com idades variando entre 8 e 10 meses, que apresentavam deficiente estado nutricional. Dentro destes, um apresentou quadro diarréico, revelando à necropsia, parasitose gastrointestinal, além de lesões de severa enterite. Do exame bacteriológico da mucosa intestinal, isolou-se *Yersinia pseudotuberculosis* pertencente ao soro-grupo O III, em cultura pura. Os autores chamam a atenção a este caso pouco frequente de enterite purulenta por *Yersinia pseudotuberculosis* em bovinos.

Na Grã-Bretanha, MAIR & HARBOURNE (1963) relataram

o isolamento de *Pasteurella pseudotuberculosis* pertencente ao sorogrupo OI, sub-grupo A, do conteúdo estomacal de um feto bovino de aproximadamente seis meses de idade, sem lesões aparentes. Neste caso a vaca, apresentava anticorpos contra o referido microrganismo. Os autores citam que na literatura consultada encontraram apenas duas referências da ocorrência deste microrganismo nesta espécie animal.

No mesmo país anterior, MAIR (1965), sorotipou 177 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, recebidas durante o período de 1961 a 1964. Destas, 169 foram isoladas de animais domésticos, silvestres e de laboratório. Cinquenta e três cepas provieram de animais de fazenda ou de estimação e entre estas, apenas 2 foram isoladas de bovinos. Ambas pertenciam ao sorogrupo O I, sub-grupo A.

Também na Grã-Bretanha, BREWER & CORBEL (1983), utilizando crioenriquecimento a 4°C durante 21 dias, examinaram à nível de matadouro, 576 conteúdos fecais e 226 fragmentos de órgãos bovinos, com objetivo de isolar *Yersinia enterocolitica*. Foram isoladas 5 cepas de *Yersinia enterocolitica* de conteúdos fecais e 1 cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* de um linfonodo. Os autores citam ainda que receberam de um centro de investigação veterinária uma cepa de *Yersinia enterocolitica* isolada do conteúdo estomacal de um feto bovino abortado. Chamam atenção ainda, tendo em vista a literatura consultada, para o pequeno número de isolamentos de *Yersinia enterocolitica* e demais espécies do gênero, a partir de amostras bovinas associadas ou não a doenças.

No mesmo país, WALLS & LEVETT (1988), utilizando metodologia seletiva (crioenriquecimento e meios com anti-

bióticos), pesquisaram *Yersinia* sp. em 57 amostras fecais pertencentes a vacas leiteiras. Foram isoladas 23 cepas de *Yersinia enterocolitica*, duas cepas de *Yersinia frederiksenii* e uma cepa de *Yersinia intermédia*.

No Japão ZEN-YOJI et alii (1974), investigaram a presença de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* em 200 conteúdos cecais e em 197 linfonodos mesentéricos de bovinos sadios, a nível de matadouro. Não obtiveram êxito no isolamento dos citados microrganismos apesar do uso de técnica de crioenriquecimento.

Em outro trabalho no Japão, FUKUSHIMA et alii (1983), procurando determinar se os isolamentos de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia intermedia* a partir de leite crú eram devidas a vacas portadoras e se suas fezes poderiam ser fonte de tais contaminações no leite, examinaram 618 amostras de fezes colhidas diretamente do reto de vacas leiteiras, pertencentes a 87 estabelecimentos rurais. Obtiveram isolamento de quatro cepas de *Yersinia enterocolitica*; sete cepas de *Yersinia kristensenii* e uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O II, sub-grupo B. Segundo os autores foi o primeiro isolamento desta última espécie bacteriana em bovinos no país, tendo em vista a literatura consultada.

TSUBOKURA et alii (1984), realizaram um trabalho de sorotipagem em 197 cepas isoladas no Japão e 28 isoladas na Europa. Estas cepas eram de origem humana e de 12 diferentes espécies animais. Nenhuma cepa fora isolada de bovinos.

Nos Estados Unidos, WETZLER & HUBBERT (1968), relatando as inúmeras cepas de *Pasteurella pseudotuberculosis* isoladas de mamíferos na América do Norte citaram o isolamen-

to de uma delas, procedente de uma vaca doente. Não descrevem de que material foi isolada, porém ressaltam que esta cepa pertencente ao sorogrupo O III, apresentou reações bioquímicas fermentáveis atípicas, destacando-se por isto das demais.

Ainda nos Estados Unidos, no Estado do Maine, HUBBERT (1972) relatou o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III do pulmão de um bezerro de três meses de idade que morreu após pneumonia e enterite com uma semana de duração.

No Canadá, LANGFORD (1969) descreveu o isolamento de *Pasteurella pseudotuberculosis* em três ocasiões distintas. No primeiro caso, referia-se ao isolamento do microrganismo do fígado e estomago de um feto que tinha sido abortado aos seis meses de gestação. O segundo, referia-se ao isolamento à partir do tecido placentário necrosado de uma vaca que abortou e no terceiro caso, de um pulmão pneumônico de um bezerro.

Na Russia, ULYANOVA (1961), com o objetivo de pesquisar *Yersinia pseudotuberculosis* na região de Leningrado nos anos de 1955 a 1959, examinou bacteriologicamente 20.000 roedores, bem como carapatos retirados de bovinos. Foram isoladas 37 cepas do referido microrganismo, sendo que três delas isoladas de carapatos do gênero *Ixodes ricinus*. O estado de saúde dos animais não é mencionado no trabalho.

Na Suiça, MESSERLI (1972) isolou *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O II, de um caso de mastite bovina, afetando todos os quartos mamários. Apesar do tratamento com antibióticos eficazes "in vitro", a mastite persistiu, com eliminação do microrganismo pelo leite. O animal foi sacrificado.

cado e à necropsia, as alterações registradas restringiram-se ao úbere. Dos tecidos aparentemente sadios, foi possível isolar o microrganismo em cultura pura. O autor supõe que a infecção tenha sido contraída pelo úbere.

Na Bulgária, GELEV (1975) isolou dois microrganismos causadores de aborto bovino, sendo que um deles, com características bioquímicas muito próximas as da *Yersinia pseudotuberculosis*. Foi comprovada a patogenicidade deste microrganismo em cobaias, coelhas e ovelhas, observando-se tropismo pelo útero e ovários.

Na Itália, CABASSI et alii (1976) examinaram 250 amostras fecais bovinas e 254 linfonodos cecais, provenientes de animais da região ou colhidas em matadouro, com objetivo de isolar *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*. Uma amostra de *Yersinia pseudotuberculosis* soro-grupo O I, foi isolada de um linfonodo.

Na Nigéria, KWAGA et alii (1986), realizaram um estudo sobre a sensibilidade aos agentes antimicrobianos, apresentada pelas cepas de *Yersinia* sp. isoladas de bovinos e suínos. De 14 cepas testadas, 8 foram isoladas de bovinos. Estas cepas pertenciam as espécies *Yersinia enterocolitica* (6 cepas), *Yersinia intermedia* (1 cepa) e *Yersinia frederiksenii* (1 cepa). Nenhuma cepa pertencia a espécie *Yersinia pseudotuberculosis*.

Na Alemanha Ocidental, STEPHAN (1946), se referiu ao uso de uma cepa de *Pasteurella pseudotuberculosis* isolada de uma vaca, utilizada como antígeno em reações sorológicas.

No mesmo país, GRABER & KNAPP (1955), investigando um caso de linfadenite mesentérica causada por *Pasteu-*

Pasteurella pseudotuberculosis em um fazendeiro, encontraram evidências sorológicas desta infecção em uma vaca da propriedade deste homem, recentemente curada de uma infecção purulenta no úbere.

KNAPP (1959), após exaustiva monografia referente a *Pasteurella pseudotuberculosis* envolvendo múltiplos aspectos a respeito, citou uma referência de isolamento do referido microrganismo em bovino, realizado por MAZZINI (1897).

Ainda na Alemanha Ocidental, WEBER & LEMBKE (1981), realizaram pesquisa em 631 amostras fecais suínas e em 301 amostras fecais bovinas, coletadas a nível de matadouro, com objetivo de isolar sorogrupos de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* patogênicas ao homem. Isolaram 24 cepas de *Yersinia enterocolitica* e 5 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* a partir das amostras suínas. Dos espécies fecais bovinos não foram isolados os referidos microrganismos, apesar das técnicas de crioenriquecimento utilizadas.

No mesmo país, WEBER (1988), sorotipou 227 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, isoladas entre 1976 e 1987. Cento e cinquenta destas cepas de mamíferos, entre os quais suínos, ovinos, coelhos e gatos. Nenhuma cepa foi isolada de bovinos.

Na República Democrática Alemã, denominada de Alemanha Oriental, DEE (1985), relatou que de 2855 (dois mil, oitocentos e cinquenta e cinco) fetos bovinos abortados e envoltórios fetais examinados bacteriologicamente, entre 1976 a 1985, em três, isolou-se *Yersinia pseudotuberculosis*. Dois isolamentos em cultivo direto e o terceiro após crioen-

riquencimento a 4°C, durante 2 semanas. Os achados de necropsia variaram de caso a caso. No primeiro constataram uma dilatação intestinal, com um aumento do volume dos linfonodos mesentéricos. No segundo enterite catarral, peritonite fibrinosa com hepatomegalia e múltiplos abscessos no fígado. No terceiro caso não foram constatadas alterações perceptíveis.

Na Índia, BATRA (1979) apud BEHRA et alii (1984), com o objetivo de pesquisar *Yersinia* sp. associada a distúrbios gastrointestinais, examinou 226 amostras de fezes bovinas de animais adultos e jovens, com e sem diarréia, não obtendo êxito nos isolamentos.

No mesmo país, BEHRA et alii (1984) isolaram *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III dos conteúdos abomasal e intestinal de seis bezerros da espécie bubalina, com idade entre 6 e 9 meses. Os animais morreram durante os meses de inverno, após uma semana de adoentados, apresentando neste período, sintomas de diarréia intermitente, apatia, depressão seguida de excitação nervosa, respiração acelerada, pulso e temperatura elevados. Os exames bacteriológicos foram realizados sem prévio crioenriquecimento.

Na Nova Zelândia, HODGES et alii (1984), realizaram a identificação sorológica de 234 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de animais domésticos e silvestres, com problemas clínicos. Destas, 56 cepas tinham sido isoladas de bovinos, sendo que 51 pertenciam ao sorogrupo O III, 4 ao sorogrupo O I e 1 pertencente ao sorogrupo O II.

No mesmo país, HODGES & CARMAN (1985), examinaram 509 amostras fecais bovinas de animais aparentemente saudáveis, com idades variando de 8 a 13 meses pertencentes a

50 estabelecimentos rurais. As amostras foram colhidas nos meses de inverno, diretamente do reto destes animais, obtendo-se isolamento de 134 (26,32%) cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*. Cento e vinte cinco delas (93,2%) pertenciam ao sorogrupo O III, seis amostras (4,47%) pertenciam ao sorogrupo O I e três (2,23%) ao sorogrupo O II. Segundo os autores, deve-se ter prudência na interpretação de tais isolamentos das fezes, caso não venham acompanhados de sintomatologia diarréica. Citam ainda que de 1983 a 1984, ocorreram 251 isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* em bovinos e nos 10 anos anteriores a 1983, apenas 59. Os autores não sabem dizer se este aumento do número de isolamentos, se deve a melhoria do diagnóstico bacteriológico ou se realmente está ocorrendo uma maior incidência deste microrganismo nesta espécie animal.

Também na Nova Zelândia, BULLIANS (1987) realizou pesquisa de *Yersinia* sp. em 330 amostras de conteúdo retal de vacas e em 66 amostras de cordeiros. Das amostras bovinas foram isoladas uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* e uma cepa de *Yersinia intermedia*.

Na Austrália, CALLINAN et alii (1988) descreveram uma síndrome de diarréia e morte em bovinos, associada a *Yersinia pseudotuberculosis* pertencente ao sorogrupo O III. Foram examinadas 20 amostras de intestino delgado, 12 amostras de intestino grosso, 9 linfonodos mesentéricos, 6 pulmões, 11 fígados, 6 rins e 4 baços pertencentes a 22 animais afetados. Isolou-se o microrganismo em 17 amostras de intestino delgado (85%), 10 amostras de intestino grosso (83%) 4 amostras de linfonodos mesentéricos (44%), 1 amostra de pulmão (17%) e em 1 amostra de fígado (9%), perfazendo um total de

33 cepas isoladas. Os surtos ocorreram durante os meses de inverno e inicio de primavera. Os autores sugerem, face aos achados bacteriológicos, que *Yersinia pseudotuberculosis* seja importante agente na patogênese desta síndrome de enterocolite bovina.

Também na Australia, SLEE et alii (1988), utilizando meios seletivos para *Yersinia* sp., realizaram pesquisa de *Yersinia pseudotuberculosis* em 2639 amostras bovinas (fezes, conteúdos intestinais, sangue, fragmentos de órgãos). Destas, 222 (8,4%) mostraram-se positivas para o microrganismo. As 193 cepas caracterizadas pertenciam ao sorogrupo O III. Os autores chamam a atenção para o fato de que este sorogrupo parece ocorrer mais frequentemente afetando ruminantes.

No mesmo país, JERRET & SLEE (1989) isolaram *Yersinia pseudotuberculosis* associada a abortos bovinos no terço final de gestação, provocando lesões semelhantes as causadas pela *Brucella abortus*. O microrganismo foi isolado do feto ou dos envoltórios fetais em cultura pura, e uma ce pa pertencia ao sorogrupo O III. Os autores chamam a atenção para o fato de que este microrganismo esta mais associado a problemas entéricos nesta espécie animal podendo no entanto causar problemas abortivos.

No Brasil, segundo dados do Centro Nacional de Referência de *Yersinia* fornecidos por FALCÃO (1981), *Yersinia pseudotuberculosis* foi pouca vezes isolada com certeza. Segundo a autora, em trabalho de revisão sobre a presença de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*, na América Latina, entre 1968 a julho de 1980, foram caracterizadas apenas duas cepas do referido microrganismo, isola-

das por HOFER et alii (1979) do fígado de uma preá e por BARCELLOS & PESTANA DE CASTRO (1981) a partir de fezes diarréicas suínas.

No Estado do Paraná, OLIVEIRA et alii (1983), isolaram a partir de órgãos de búfalo (*Bubalus bubalis*), *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III. Os órgãos dos quais isolou-se o citado microrganismo foram triturados de fígado, baço e conteúdo intestinal, em cultivo direto, sem prévio enriquecimento. Apesar de não mencionado no trabalho, segundo dados da Secretaria da Agricultura, estes animais apresentavam diarréia profusa como sintomatologia principal, além da ocorrência de mortes súbitas.

No mesmo Estado, WARTH et alii (1984), isolaram a partir de órgãos (intestinos, fígado e abomaso) bem como de amostras fecais bovinas procedentes de animais com sintomatologia diarréica *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III. Os animais pertenciam a raça Nelore, de criações extensivas.

No mesmo Estado do Paraná, SUZUMURA (1984) descreveu a ocorrência de um surto de diarréia bovina atingindo 170 animais, dos quais 61 vieram a óbito apresentando taxas de mortalidade de 35,8%. Os animais apresentavam sintomatologia diarréica, anorexia, febre alta, além de outros sintomas. Foram realizados exames bacteriológicos em 10 amostras fecais, obtendo-se o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, de todas elas. O surto ocorreu nos meses de agosto e setembro, atingindo os animais jovens com idades acima de um ano numa proporção de 92%.

Ainda no Estado do Paraná, SARIDAKIS et alii (1988) descreveram o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III em três casos distintos de diarréia bovina.

Neste experimento foram realizados exames bacteriológicos em 144 animais com diarréia e em 52 animais sadios. A idade dos animais variou de 9 dias a 12 meses de idade.

No mesmo Estado, vale mencionar o isolamento de uma cepa de *Yersinia enterocolitica*, pertencente ao sorogrupo O III, biotipo 4, fagotipo IXa, também procedente de casos de diarréia bovina por WARTH et alii (1985). Tal fagotipo, segundo dados do Centro Nacional de Referência de *Yersinia*, é típico da África do Sul onde causa doença humana, sendo pela primeira vez isolado em nosso país.

Em outro trabalho similar ao anterior já citado, abrangendo metade do ano de 1980 até 1985, FALCÃO(1987) relatou que de 417 cepas pertencentes ao gênero *Yersinia* isoladas no Brasil oriundas de diversas fontes e sorotipadas no Centro Nacional de Referência de *Yersinia*, 33 foram provenientes de animais, sendo que 27 delas, identificadas como *Yersinia pseudotuberculosis*. Estas cepas, foram isoladas por WARTH et alii (1984) a partir de fezes ou fragmentos de órgãos de bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, com 24 cepas isoladas e FERREIRA et alii (1985), com 3 cepas isoladas, todas provindas no Estado do Paraná.

No Rio Grande do Sul, RIET-CORRÊA et alii (1990) descreveram a ocorrência de três surtos de diarréia em búfalos, durante os meses de inverno, nos anos de 1984 a 1987. Os exames bacteriológicos dos linfonodos mesentéricos, revelaram em cultura pura *Yersinia pseudotuberculosis*. As sorotipagens das cepas isoladas realizadas no Centro Nacional de Referências de *Yersinia*, revelaram pertencerem ao sorogrupo OI, que segundo os autores, não tinha sido isolado de búfalos até então no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL ANALISADO

3.1.1. Amostras de fezes

Nos anos de 1987 e 1988, foram examinadas quanto a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*, 220 amostras de fezes, oriundas de 220 bovinos, acometidos de diarréia, pertencentes a 91 propriedades distintas, localizadas no Estado do Paraná.

3.1.2. Amostras de conteúdos intestinais

Nos anos de 1987 e 1988, foram examinadas quanto a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*, 56 amostras de conteúdo de intestino grosso e 60 amostras de conteúdo de intestíno delgado, oriundas de 89 bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, pertencentes a 89 propriedades distintas, localizadas no Estado do Paraná.

3.2. MATERIAL DE LABORATÓRIO

3.2.1. Meios de Cultura, Reagentes e Soluções

3.2.1.1. Base de Agar Sangue e Tryptose DIFCO

Triptose	10,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	15,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 33 gramas do meio "Bacto Tryptose Blood Agar Base", (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,2 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio já esterilizado foi resfriado a temperatura de 45-50°C e adicionava-se 50 ml de sangue ovino desfibrinado. Após a homogenização, evitando a formação de bolhas de ar, foram distribuídos volumes de aproximadamente 12 ml em placas de Petri de 15 x 100 mm. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.2. Agar MacConkey

DIFCO 0075

Peptona	17,0 g
Proteose peptona	3,0 g
Lactose	10,0 g
Sais biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho Neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Agar	13,5 g

Preparo: Foram dissolvidas 50 gramas do meio "Bacto MacConkey Agar", (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebu-

lição. agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7.1 e esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio foi resfriado até a temperatura de 45-50°C e distribuído volumes de aproximadamente 12 ml em placas de Petri de 15 x 100 mm. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.3. Caldo de Infusão Cérebro e Coração

DIFCO 0037

Infusão de cérebro e coração	200,0 g
Infusão de coração de boi	250,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Dextrose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato sódico	2,5 g

Preparo: Foram dissolvidas 37 gramas do meio "Bacto Brain Heart Infusion". (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição. agitando frequentemente até a sua completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7.4 e distribuia-se a solução em volumes de 10 ml em tubos de ensaio 13 x 100 mm. Esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.4. Agar com Três Açucares e Ferro

DIFCO 0265

Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Peptona	15,0 g

Proteose e peptona	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sacarose	10,0 g
Dextrose	1,0 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Tiosulfato de sódio	0,3 g
Vermelho de Fenol	0,024 g
Agar	12,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 65 gramas do meio "Bacto Triple Sugar Iron Agar", (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,4 e distribuia-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Resfriava-se os tubos, em posição inclinada, de modo que o meio no fundo do tubo, alcançasse uma profundidade de 1,5 a 2 cm e formasse na superfície uma base inclinada. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.5. Agar Uréia de Christensen MERCK 8492

Meio Base

Peptona de carne	1,0 g
D (+) Glicose	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Potássio dihidrogenofosfato	2,0 g
Vermelho de Fenol	0,012 g
Agar	12,0 g

Aditivo:

Uréia	20,0 g
-------------	--------

Preparo: Foram dissolvidas 21 gramas do meio base "Agar Uréia de Christensen", (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulação, agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 6,8 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio base era resfriado até 45°C e incorporava-se no mesmo 50 ml de solução (esterilizada por filtração) de uréia a 40%. Distribuia-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e resfriava-se os mesmos em posição inclinada. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.6. Meio de SIM (H_2S , Indol, Motilidade)**DIFCO 0271**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	30,0 g
Ferro peptonizado	0,2 g
Tiosulfato de sódio	0,025 g
Agar	3,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 36 gramas do meio "Bacto SIM Medium", (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulação, agitando frequentemente, até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,3 e distribuia-se a solução em tubos de ensaio a uma altura de aproximadamente 4 cm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e deixava - se solidificar mantendo-os em posição vertical. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.7. Caldo base de ensaio de Ornitina des-
carboxilase

MERCK 6934

Meio Base

Peptona de carne	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
D (+) Glicose	1,0 g
Púrpura de bromocresol	0,016 g
Aditivo:	
L-ornitina monocloridrato	5,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 9 gramas do meio base "Caldo Base de ensaio de Ornitina descarboxilase". (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e ajustava-se o pH em 6,8. Aquecia-se até o ponto de ebulação, agitando frequentemente até completa dissolução. A base era então dividida em duas porções iguais: numa adicionava-se L-ornitina monocloridrato a 0,5%, enquanto a outra porção era utilizada como controle. O meio era distribuído em tubos de 13 x 100 mm em volumes de 5 ml, adicionava-se vaselina estéril e autoclavado a 121°C por 10 minutos. Os mesmos eram mantidos a 4°C na geladeira.

3.2.1.8. Caldo Base de KCN. seg. Moller

MERCK 5412

Proteose peptona	3,0 g
Potássio dihidrogenofosfato	0,225 g
Disódio hidrogenofosfato	5,640 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Aditivo:	
Cianeto de potássio	0,075 g
pH após esterilização: 7,6	

Preparo: Foram dissolvidas 13,8 gramas do meio "Caldo de KCN". (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando frequentemente até a completa dissolução. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e após o completo resfriamento, adicionava-se 15 ml de uma solução de KCN a 0,5% (0,5 gramas de KCN em 100 ml de água destilada estéril). Distribuia-se assepticamente a solução em volumes de 4 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm esterilizados e cobria-se o meio de cultivo com parafina líquida espessa, de modo a formar um tampão de aproximadamente 5 mm de altura. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.9. Agar Fenilalanina

DIFCO 0745

Extrato de levedura	3,0 g
Fosfato dipotássico	1,0 g
Cloreto de sódio	2,0 g
DL-Phenylalanina	2,0 g
Agar	12,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 23 gramas do meio "Bacto Phenylalanina Agar", (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7.3 e distribuia-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e resfriava-se os tubos na posição inclinada até a solidificação. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.10. Agar Citrato de SIMMONS MERCK 2501

Amonio dehidrogenofosfato	1,0 g
Di-Potássio hidrogenofosfato	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Citrato de sódio	5,0 g
Sulfato de magnésio	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	12,00 g

Preparo: Foram dissolvidas 22 gramas do meio Agar Citrato, seg. SIMMONS . (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 6,9 e distribuia-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e resfriava-se os tubos na posição inclinada até a solidificação do ágar. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.1.11. Caldo Vermelho de Fenol MERCK 10987**Meio Base**

Peptona de caseina	5,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho de Fenol	0,018 g

Aditivo:

Carbohidrato desejado	10,0 g
-----------------------------	--------

Preparo: Foram dissolvidas 15 gramas do meio base "Caldo Vermelho de Fenol", (MERCK, 1982) em 1000 ml de água destilada. Deixava-se

hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulação. agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7.4. O meio era, em seguida, dividido em porções de 45 ml e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Paralelamente, eram preparadas soluções aquosas a 10% dos carboidratos a serem utilizados (glicose, lactose, sacarose, cellobiose, sorbose, sorbitol, rhmanose, melibiose e amidalina, as quais eram esterilizadas por filtração em filtro Seitz. Posteriormente, a cada porção do meio eram adicionados 5 ml da solução de carboidrato correspondente e a mistura, distribuída em volumes de 5 ml em tubos de 13 x 100 mm. Estes meios eram mantidos em geladeira a 4°C. Os tubos correspondentes à glicose continham tubo invertido de Durham.

3.2.1.12. Agar Mueller-Hinton

MERCK 5437

Infusão de carne	5.0 g
Caseina hidrolizada	17,5 g
Amido	1,5 g
Agar	12,5 g

Preparo: Foram dissolvidas 36,5 gramas do meio "Agar Mueller - Hinton" (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulação agitando frequentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7.4 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuia-se volumes de aproximadamente 20 ml em placas de Petri de 15 x 150 mm. Os meios eram mantidos a 4°C em geladeira.

3.2.1.13. Meio de Lignières. seg. BIER (1978)

Extrato de carne	5,0 g
Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Gelatina	5,0 g
Agar	8,0 g
pH: 7,4	

Preparo: Foram dissolvidas 33 gramas do "Meio de Lignières" , (BIER, 1978) desidratado em 1000 ml de água de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulação, agitando frequentemente até a completa dissolução. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e distribuia-se volumes de aproximadamente 5 ml em fracos do tipo "penicilina", já previamente esterilizados. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

**3.2.1.14. Reativo de Ehrlich. para prova do Indol
seg. KONEMAN et alii. 1983**

Paradimetilaminobenzaldeido	1,0 g
Ácido clorídrico concentrado	40,0 ml
Álcool etílico abisoluto	190,0 ml

**3.2.1.15. Reativo para a prova da Fenilalanina
desaminase. seg. KONEMAN et alii. 1983**

Cloreto férrego	10,0 g
HCl concentrado	2,5 g
Água destilada	100,0 ml

3.3. METODOLOGIA EMPREGADA

3.3.1. Colheita das amostras de fezes

As amostras de fezes eram colhidas diretamente da ampola retal, com sacos plásticos apropriados a guiza de luvas, os quais eram devidamente fechados, identificados e a condicionados em caixas de isopor com blocos de gelo e remetidos ao laboratório onde eram efetuadas as análises bacteriológicos. (I.P.V.D.F., 1981; HODGES & CARMAN, 1985; TINAJERO & PONCE, 1988).

3.3.2. Colheita das amostras de conteúdo intestinal

Essas amostras eram obtidas de segmentos de alças intestinais, ligadas nas extremidades, colhidas com o máximo de assepsia durante a necropsia. As peças eram embaladas em sacos plásticos apropriados, devidamente identificados e após o acondicionamento em caixas de isopor com blocos de gelo, eram remetidas ao laboratório onde eram efetuadas as análises bacteriológicas. (I.P.V.D.F. 1981; TINAJERO & PONCE, 1988).

3.3.3. Preparo das amostras

As amostras de fezes eram inoculadas diretamente nos meios de cultura, enquanto que as alças intestinais eram abertas com a utilização de tesoura e pinça esterilizadas e as análises efetuadas a partir do conteúdo intestinal.

3.3.4. Isolamento e identificação de *Yersinia pseudotuberculosis*

3.3.4.1. Enriquecimento seletivo-crioenriquecimento (BERCOVIER & MOLLARET, 1984)

Em tubos de ensaio contendo 10 ml de Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (PATERSON & COOK, 1963), eram inoculadas as amostras de fezes e conteúdo intestinal, em quantidades de aproximadamente 10% do volume do meio (1 g ou 1 ml dependendo da consistência das fezes). A incubação era realizada em geladeira, com temperaturas em torno de 4°C, por períodos de 7, 14 e 21 dias, quando então as culturas eram semeadas em placas de Petri contendo Agar Sangue e Agar MacConkey (LANGFORD, 1972b).

3.3.4.2. Plaqueamento

A partir das amostras de fezes e conteúdo intestinal, bem como das culturas em caldo de infusão de cérebro com 7, 14 e 21 dias de incubação a 4°C, eram efetuadas semeaduras com a utilização de alça de cromo níquel em placas de Petri contendo Agar Sangue (MARTIN & WASHINGTON, 1980; BERCOVIER & MOLLARET, 1984) e Agar MacConkey (FALCÃO, 1976; TSUBOKURA et alii, 1976; FALCÃO et alii, 1979; MARTIN & WASHINGTON, 1980; BERCOVIER & MOLLARET, 1984). Após incubação a 37°C por 24-48 horas (FALCÃO et alii, 1979) com o auxílio de microscópio estereoscópico, dez colônias que se apresentavam de tamanho pequeno a médio não fermentadoras da lactose e dez colônias de semelhantes dimensões não hemolíticas no Agar Sangue se presentes, eram repicadas em meio para iden-

tificação presuntiva.

3.3.4.3. Identificação presuntiva

As colonias suspeitas eram inoculadas em tubos contendo Agar com Três Açucares e Ferro (T S I) os quais eram incubados a 37°C por 24-48 horas. O crescimento bacteriano da superfície do meio de identificação presuntiva que apresentava reações bioquímicas compatíveis com as produzidas pela *Yersinia pseudotuberculosis* (FALCÃO, 1976) ou seja: Fermentação da Glicose no fundo do tubo, sem produção de gás.

Fermentação positiva ou negativa da sacarose no ápice.

Não produção de H₂S, eram então, submetidos a prova da Urease (GINI & TORRES, 1979) levando em conta, os seguintes critérios:

Prova da Urease: nesta prova, a cultura em estudo era inoculada em Agar Uréia por um período de incubação de 72 horas a 28°C (BERCOVIER & MOLLARET, 1984). O resultado era considerado positivo quando ocorria o aparecimento da cor vermelha forte, decorrente da alcalinização do meio (KONEMAN et alii, 1983). Os tubos que apresentaram hidrólise da uréia eram submetidos as provas de identificação definitiva.

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo uma cepa de *E. coli*.

3.3.4.4. Identificação definitiva

Para a realização da caracterização bioquímica

definitiva da espécie *Yersinia pseudotuberculosis*, foram realizadas as provas consideradas de maior valor, preconizadas por FALCÃO (1976), GINI & TORRES (1979) e BERCOVIER & MOLLARET (1984).

Prova do crescimento em presença de KCN.

Prova da Fenilalanina desaminase.

25°C

Prova de motilidade a diferentes temperaturas

37°C

Prova de Descarboxilação da Ornitina.

Prova do Indol.

Prova do Citrato.

Prova de Fermentação dos seguintes carbohidratos: glicose, lactose, sacarose, cellobiose, sorbose, sorbitol, rhamnose, melibiose e amidalina.

As provas acima citadas foram realizadas e interpretadas levando em conta os seguintes critérios:

Prova do crescimento em presença de KCN: para a realização desta prova, a cultura em estudo era inoculada em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (B H I) durante 24 horas a 37°C . Após este período, uma alçada do caldo com crescimento era inoculada no Caldo KCN, o qual era incubado a 37°C por 72 horas conforme BERCOVIER & MOLLARET (1984). A prova era considerada positiva quando havia crescimento no caldo, denotado pela turvação do meio e negativa quando este permanecia límpido (EDWARDS & EWING, 1972).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas vulgaris* e como controle negativo uma cepa de *E. coli*.

Prova da Fenilalanina desaminase: A cultura era semeada na superfície do meio Agar Fenilalanina (inóculo pesado) e incubado 72 horas a 28°C . Após o período de incubação, pingava

se 4 a 5 gotas do reativo para a prova da Fenilalanina desaminase na superfície do crescimento. Ao acrescentar o reativo, agitava-se o tubo até ocorrer o desprendimento das colonias na superfície do meio. Considerava-se a prova positiva quando ocorria o aparecimento da cor verde e negativa quando não ocorria o surgimento desta cor (EDWARDS & EWING, 1972).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo, uma cepa de *E. coli*.

Prova da motilidade a diferentes temperaturas: nesta prova eram utilizados dois tubos do meio de S I M. As culturas eram semeadas em profundidade, com o auxílio de agulha de níquel-cromo, até aproximadamente dois terços da altura do meio e incubadas por 48-72 horas a diferentes temperaturas. Um tubo na temperatura de 25°C e outro a 37°C, conforme BERCOVIER & MOLLARET (1984). Os tubos que apresentavam crescimento bacteriano confinado a linha de picada eram considerados negativos ou imóveis e aqueles que apresentavam crescimento bacteriano difuso eram considerados positivos.

Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

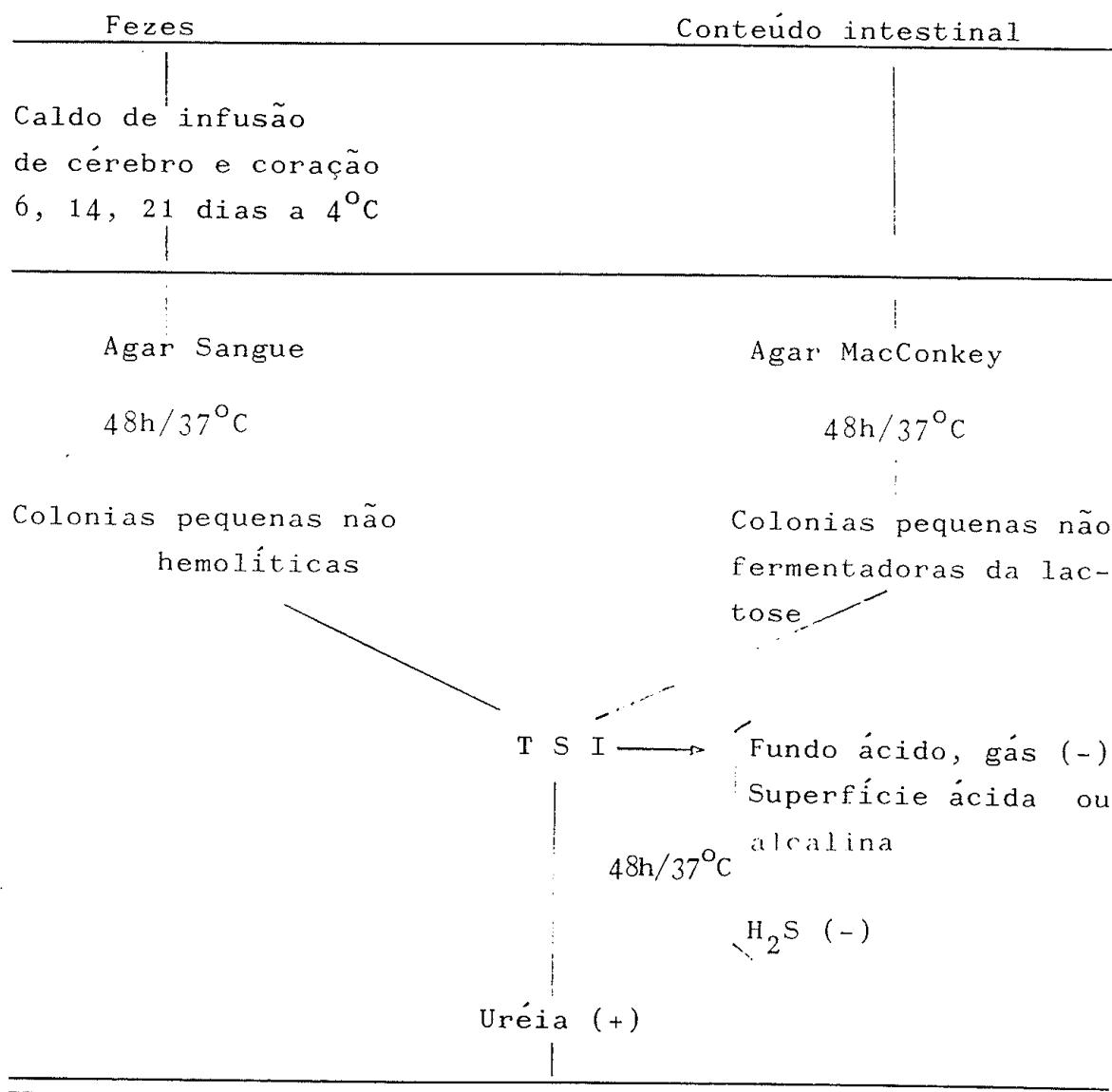
Prova de descarboxilação da Ornitina: nesta prova, eram utilizados dois tubos: O primeiro, considerado "tubo controle", contendo apenas o meio base sem Ornitina e o segundo o meio base com o aminoácido (meio completo). As culturas eram inoculadas com o auxílio de agulha de níquel-cromo. Incubava-se a 28°C durante 3 dias, conforme BERCOVIER & MOLLARET (1984), com observações diárias. O desenvolvimento da cor amarela nos dois tubos inoculados, após o período de incubação preco-

nizado, significava que a cultura era negativa para a prova da descarboxilação da Ornitina. Ao passo que o desenvolvimento da cor amarela no tubo controle e da cor púrpura no tubo contendo o meio completo era considerado positivo para esta prova (KONEMAN et alii, 1983). Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *E. coli* e como controle negativo, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

Prova do Indol: Para a realização desta prova, eram utilizados o meio de S I M. As culturas que apresentavam mobilidade positiva a 25°C e mobilidade negativa a 37°C eram submetidos a esta prova, que consistia em adicionar 1 ml de cloroformio sobre a superfície do meio. Após realizar leve agitação do tubo, deixava-se alguns minutos em repouso e acrescentava-se 5 gotas do Reativo de Ehrlich. O desenvolvimento da cor vermelha na interface do meio em até 5 minutos, era considerado como positivo para a prova do Indol, ao passo que o não desenvolvimento desta cor, era considerado negativo (KONEMAN et alii, 1983). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

Prova de Fermentação de Carbohidratos: as culturas em estudo eram submetidas as provas de fermentação no Caldo Vermelho de Fenol, com os seguintes carbohidratos: glicose, lactose, sacarose, cellobiose, sorbose, sorbitol, rhamnose, melibiose e amidalina. Os tubos eram incubados a 28°C durante 3 dias, com observações diárias, como recomendado por BERCOVIER & MOLLARET (1984). As provas eram consideradas como positivas quando ocorria a viragem do indicador vermelho de fenol para a cor amarela indicando acidez, e negativos aqueles que permaneciam da mesma cor.

Metodologia utilizada no isolamento de
Yersinia pseudotuberculosis



KNC	FENILALANINA	MOBILIDADE	ORTININA	INDOL	CITRATO
(-)	DESAMINASE	25°C (+)	<u>DESCARBOXI</u>	(-)	(-)
(-)		37°C (-)	LASE (-)		

Provas de fermentações de carbohidratos:

Glicose (+)/Gás (-)	Rhamnose (+)	Melibiose (+)
Cellobiose (-)	Lactose (-)	Sacarose (-)
Amidalina (-)	Sorbose (-)	Sorbitol (-)

A produção de gás à partir da glicose era verificada no Tubo de Durham.

3.3.5. Sensibilidade e resistência aos antibióticos e quimioterápicos

As cepas isoladas eram submetidas a testes de sensibilidade através do Método de Difusão em Agar, segundo a técnica do disco único de BAUER et alii (1966). Foram utilizados discos da marca Laborclin, cujo controle de qualidade foi realizado com a cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922, com os seguintes princípios ativos e concentrações:

Tetraciclina	(30 µg)
Cloranfenicol	(30 µg)
Estreptomicina	(10 µg)
Amicacina	(30 µg)
Colistina	(10 µg)
Ampicilina	(10 µg)
Gentamicina	(10 µg)
Kanamicina	(30 µg)
Penicilina	(10 U.I.)
Neomicina	(30 µg)
Cefalotina	(30 µg)
Novobiocina	(30 µg)
Polimixina-B	(300 µg)
Sulfonamidas	(300 µg)
Sulfa/Trimetoprim	(25 µg)
Nitrofurantoína	(300 µg)

3.3.6. Sorotipagem

As cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* identificadas

cadas através de provas bioquímicas eram mantidas em meio de manutenção de Lignières (BIER, 1978), selados, a temperatura ambiente (BRECOVIER & MOLLARET, 1984) e posteriormente, enviadas para o Centro Nacional de Referência de *Yersinia*, localizado na Faculdade de Farmácia da UNESP - Campus de Araquara-SP, para a identificação dos sorogrupos envolvidos nos casos de diarréia bovina.

3.3.7. Patogenicidade a cobaios (*Cavia cobaya*)

A verificação da patogenicidade a cobaios dos possíveis sorogrupos de *Yersinia pseudotuberculosis* isolados de casos de diarréia bovina no Estado do Paraná, era realizada, administrando-se pela via oral uma suspensão bacteriana, conforme recomendado por MOLLARET et alii (1982) e BERCOVIER & MOLLARET (1984). Para isto, utilizou-se a técnica descrita por LAIRD & CAVANAUGH (1980), PAI & DESTEPHANO (1982) e ROBINS-BROWNE & PRERIC (1984), que consiste em privar os animais de água por 24 horas, após as quais é oferecido aos mesmos uma suspensão aquosa contendo 10^9 células por ml do sorogrupo em questão. Neste experimento utilizou-se 6 cobaios divididos em dois grupos de três animais. Destes três, 1 permanecia como testemunha, não recebendo a suspensão bacteriana, mas água potável, até o final do experimento. Ao primeiro grupo a suspensão administrada foi obtida cultivando-se o microrganismo em caldo de B.H.I., após incubação a 4°C , durante 20 dias. Ao segundo grupo, a suspensão foi obtida em caldo de B.H.I., após incubação a 28°C , durante 48 horas. Após 24 horas posteriores à administração oral a suspensão bacteriana era retirada, e aos animais era oferecido água potável novamente. A patogenicidade

era verificada através do exame diário dos animais e anotadas as alterações clínicas verificadas como: tristeza e abatimento, anorexia, pelos arrepiados, emagrecimento, diarréia, constipação intestinal e morte. A confirmação da participação da *Yersinia pseudotuberculosis* no quadro clínico observado era feita pelo isolamento do microrganismo nas fezes e nos órgãos desses animais.

3.3.8. Isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* de casos de diarréia bovina e sua ocorrência nos meses mais frios do ano

A Yersiniose pseutotuberculosa é considerada uma doença sazonal, de maior incidência nos meses de inverno (MAIR, 1975; BERCOVIER & MOLLARET, 1984).

Para verificar se tal sazonalidade também acontece no Estado do Paraná, foram anotados os meses e as estações do ano em que ocorreram os casos de diarréia bovina positivos para *Yersinia pseudotuberculosis*. Para tanto, considerou-se como verão os meses de janeiro, fevereiro e março; outono, os meses de abril, maio e junho; inverno, os meses de julho, agosto e setembro; e primavera, os meses de outubro, novembro e dezembro.

Os dados obtidos foram analisados, segundo tabelas de contingência, onde através do teste de qui - quadrado (χ^2) ao nível de 1% de significância procurou-se determinar a existência ou não da associação entre as variáveis, segundo STEEL & TORRIE (1960).

3.3.9. Possível envolvimento de roedores na transmissão do microrganismo aos bovinos

Com o objetivo de verificar este possível envolvimento no desencadeamento da doença aos bovinos, procedeu-se a captura de roedores, em duas propriedades nos municípios de Faxinal e Ivaiporã que possuíam animais apresentando diarréia, com isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* no ano de 1988. Para tanto, foram utilizadas 43 armadilhas de arame galvanizado com as seguintes dimensões: 30 armadilhas medindo 30 cm de altura e largura por 50 cm de comprimento e 13 armadilhas medindo 20 cm de altura e largura por 35 cm de comprimento. Ambas as armadilhas possuíam abertura do tipo "alçapão", a qual se fecha imediatamente após o roedor tocar na "isca". Como "iscas" foram utilizadas, pedaços de frutas (banana, coco), espigas de milho, e pedaços de gordura suína ou "toucinho", segundo recomendações técnicas do Museu de História Natural do "Capão da Imbuia" em Curitiba. Estas armadilhas foram colocadas próximas de instalações do tipo galpões (paióis, celeiros, abrigos para os animais), bem como de aguadas (ribeirões, açudes, lagoas, etc...) destas mesmas propriedades. A cada 24 horas eram realizadas vistorias, retirados os roedores capturados e rearmadas no mesmo local ou próximas a este, por um período de duas semanas. Os roedores capturados foram sacrificados por "afogamento", colocados em sacos plásticos e enviados ao laboratório para os procedimentos bacteriológicos e de identificação taxonômica da família, do gênero e da espécie do roedor, quando possível. O preparo das amostras de conteúdos intestinais destes roedores, assim como a metodologia utilizada no isolamento e identificação das possíveis cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, e-

ram realizadas conforme já descritas para as amostras bovinas nos ítems 3.3.3 e 3.3.4.

3.3.10. Bacteriológicos obtidos em culturas primárias^{*} e secundárias^{} no isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis***

A técnica do crioenriquecimento a temperaturas de 3 a 4°C tem sido utilizada como auxílio no isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis*, com períodos de incubação que variam de poucos dias até 4 semanas (PATERSON & COOK, 1963; ZEN-YOJI et alii, 1974; OBERHOFER & PODGORE, 1980; VAN NOYEN et alii, 1980; FUKUSHIMA et alii, 1983). As culturas, inicialmente negativas, com o uso da referida técnica podem tornar-se positivas, devido as características deste microrganismo que se multiplica nestas temperaturas em detrimento de outros (PATERSON & COOK, 1963; EISS, 1975; BERCOVIER & MOLLARET, 1984).

Para tanto, naquelas culturas em que os resultados bacteriológicos iniciais foram negativos, observou-se a eficiência da técnica do crioenriquecimento com 7, 14 e 21 dias de incubação na temperatura em torno de 4°C.

3.3.11. Prováveis morbidades e mortalidades bovinas atribuídas a infecção pela *Yersinia pseudotuberculosis* nos rebanhos afetados pela síndrome diarréica

Foram observadas as taxas percentuais referentes

^{*}Culturas submetidas ao plaqueamento direto.

^{**}Culturas submetidas ao plaqueamento do crioenriquecimento em caldo de BHI a 4°C por 7, 14 e 21 dias.

as morbidades e as mortalidades bovinas verificadas nas fazendas que tiveram animais com sintomas diarréicos, com resultados bacteriológicos positivos para *Yersinia pseudotuberculosis*.

A população bovina de cada fazenda foi dividida em três faixas etárias distintas. Considerou-se como bezerros, os animais que tinham idades de até 1 ano; novilhos, de 1 a 2 anos e adultos aqueles com idades superiores a 2 anos.

4. RESULTADOS

4.1. COPROCULTURAS

Na Tabela 1 e Figura 1, é apresentado o número de amostras de fezes em que foi verificada a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*. Pelos dados da tabela e do gráfico, observa-se que de um total de 220 amostras analisadas, 46 (21,0%) delas mostraram-se positivas para *Yersinia pseudotuberculosis*, enquanto que as 174 (79,0%) restantes apresentaram-se negativas.

4.2. CULTURAS DE CONTEÚDO DE INTESTINO DELGADO

Na Tabela 1 e Figura 2, é apresentado o número de amostras de conteúdo de intestino delgado em que foi verificada a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*. Observa-se que de um total de 60 amostras analisadas, em 9 (15,0%) delas foi verificada a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*, enquanto que as 51 (85,0%) restantes apresentaram-se negativas.

4.3. CULTURAS DE CONTEÚDO DE INTESTINO GROSSO

Na Tabela 1 e Figura 3, é apresentado o número

de amostras de conteúdo de intestino grosso em que foi verificada a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*. Observa-se que de um total de 56 amostras analisadas, em 5 (9,0%) delas foi verificada a presença de *Yersinia pseudotuberculosis*, enquanto que 51 (91,0%) restantes apresentaram-se negativas.

4.4. PROVAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

Na Tabela 2, são apresentadas as características de sensibilidade "in vitro" das 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de fezes e conteúdos intestinais bovinos. Verifica-se que todas elas apresentaram mesmo perfil de sensibilidade e resistência aos antibióticos e quimioterápicos, ou seja:

Sensibilidade a Tetraciclina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Penicilina, Ampicilina, Amicacina, Colistina, Cefalotina, Polimixina-B, Nitrofurantoína.

Resistência a Novobiocina, Sulfonamidas, Sulfa/Trimetoprim.

4.5. SOROTIPAGENS

Na Tabela 3 e 4 é apresentado o resultado das sorotipagens das 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* realizadas no Centro Nacional de Referência de *Yersinia*. Verifica-se que todas as cepas pertencem ao sorogrupo O III.

4.6. PROVAS DE PATOGENICIDADE A COBAIOS

Escolheu-se aleatoriamente a cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III com o número de registro 731-88 para a realização das provas.

A Tabela 5 mostra a frequência do isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III das fezes de cobaios, em dias subsequentes a administração oral de suspensões bacterianas obtidas a 4°C e a 28°C. Na infecção obtida através da suspensão a 4°C, verificou-se que em um dos animais, a *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III foi isolada no 1º dia pós-administração, enquanto que no outro, este fato ocorreu somente no 3º dia. No primeiro animal, que pereceu aos 11 dias pós-infecção, observa-se na Tabela 5 que a partir do 6º dia, a *Yersinia pseudotuberculosis* não mais foi isolada das fezes. No segundo animal, que veio a óbito aos 13 dias, este fato foi verificado a partir do 8º dia.

Com relação aos animais infectados com a suspensão de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III cultivada a 28°C, pode ser observado na Tabela 5, que este microrganismo foi isolado das fezes dos dois animais, nas primeiras 24 horas pós-infecção e que ambos pereceram com 32-34 horas após o início do experimento, apresentando cultivo positivo para *Yersinia pseudotuberculosis* nas fezes.

Na Tabela 6, é apresentado o resultado do isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III nos órgãos de cobaios infectados, com suspensões cultivadas a 4°C e 28°C. Verifica-se que a infecção produzida com a suspensão a 4°C, levou ao isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* do intestino delgado do cobaio B e dos abscessos hepá-

ticos dos dois animais (A e B). Já nos animais infectados com a suspensão cultivada a 28°C, o isolamento ocorreu a partir dos conteúdos estomacais, intestinais (delgado e grosso) e do fígado dos dois cobaios (A e B).

4.7. ISOLAMENTO DE *Yersinia pseudotuberculosis* E SUA OCORRÊNCIA NOS MESES MAIS FRIOS DO ANO

Comprovou-se estatisticamente que existe associação entre os isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* e a sua ocorrência nos meses mais frios do ano (meses invernais) dos anos de 1987 ($\chi^2_{.01} = 18,85$) e 1988 ($\chi^2_{.01} = 18,36$).

Nas Tabelas 7 e 8, bem como nas Figuras 4 e 5 é apresentado o número de casos de isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* no período de 1987 e 1988, distribuídos durante os meses do ano. Verificou-se, durante o ano de 1987 a concentração dos 22 casos positivos, durante 4 meses do ano, abrangendo duas estações: outono e inverno. Distribuindo estes 22 casos mensalmente, verificou-se no mês de junho a ocorrência de 3 casos, julho com 5 casos, agosto com 4 casos e setembro com 10 casos. Os meses de início de cada caso, estão discriminadas na Tabela 9.

Distribuídos os casos de diarréia bovina do ano de 1987 nas suas respectivas estações de ocorrência, verifica-se na Figura 6 que no verão e primavera, não ocorreram casos positivos de diarréia por *Yersinia pseudotuberculosis*. Na estação de outono, 20% dos casos de diarréia foram positivos para o microrganismo e no inverno 24%.

No ano de 1988, houve a concentração dos 33 casos positivos em 5 meses do ano, abrangendo também as mesmas

estações: outono e inverno. Distribuídos estes 33 casos men-
salmente, verificou-se a ocorrência nos meses de maio e ju-
nho, de apenas 1 caso em cada mês, em julho 6 casos, em agos-
to 21 casos e setembro com 4 casos. Os meses de início de ca-
da caso, estão discriminados na Tabela 10.

Distribuídos os casos de diarréia bovina no ano
de 1988 nas suas respectivas estações de ocorrência, verifi-
ca-se na Figura 7 que no verão e primavera, não ocorreram ca-
sos de diarréia positivas para *Yersinia pseudotuberculosis*.
Na estação de outono, 18% dos casos de diarréia foram positivos
para o microrganismo e no inverno 33%.

Acumulando os casos de diarréia bovina positivos
para Yersiniose pseudotuberculosa durante os dois anos estu-
dados nas suas respectivas estações, verifica-se na Figura 8.
que 19% deles foram positivos no outono e 29% no inverno. No ve-
rão e primavera não ocorreram casos positivos.

4.8. POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE ROEDORES NA TRANSMISSÃO DO MI- CRORGANISMO AOS BOVINOS

No ano de 1987 foram capturados 15 roedores per-
tencentes taxonomicamente a duas Famílias e a três diferen-
tes gêneros (*Rattus* sp, *Akodon* sp e *Nectomys* sp). Estes ani-
mais foram capturados em duas fazendas, localizadas no mu-
nícpios de Ivaiporã e Faxinal, no Estado do Paraná.

Os exames bacteriológicos das 30 amostras de con-
teúdos intestinais (15 conteúdos de intestino delgado e 15
conteúdos de intestino grosso) resultaram negativos, quando
pesquisados para *Yersinia pseudotuberculosis*. Na Tabela 11 é
apresentada a relação dos 15 roedores capturados e identifi-

cados taxonomicamente quanto à família, gênero e espécie, quando possível.

4.9. RESULTADOS OBTIDOS EM CULTURAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS NO ISOLAMENTO DE *Yersinia pseudotuberculosis*

A metodologia de isolamento utilizada neste estudo, possibilitou o isolamento de 60 cepas do citado microrganismo. Destas 60 cepas isoladas durante os anos de 1987 e 1988, 44 (73,33%) delas, foram obtidas em culturas primárias, ou seja, culturas não submetidas a prévio crioenriquecimento a 4°C. As 16 (26,66%) restantes só foram obtidas mediante o uso de crioenriquecimento a 4°C. Destas 16 cepas obtidas mediante esta técnica, 11 (18,3%) delas foram isoladas após 7 dias de crioenriquecimento, 3 (5,0%) delas, após 14 dias e 2 (3,3%) delas somente após 21 dias. Estes dados estão demonstrados nas Tabelas 12 e 13 e Figura 9. Em relação às cepas isoladas durante o ano de 1987, observa-se na Tabela 12, que as culturas 941-3 e 941-4 inicialmente negativas, tornaram-se positivas com 7 dias e continuaram com o mesmo resultado no 14º e 21º dia de incubação. Em relação às cepas isoladas durante o ano de 1988, observa-se na Tabela 13, que o mesmo aconteceu com as culturas nºs 424, 618, 623, 742-2, 742-3, 742-4, 742-5, 742-6 e 742-7.

Observa-se na Tabela 13, que todas estas culturas citadas, tornaram-se positivas após 7 dias de crioenriquecimento, continuando a dar estes resultados no 14º e 21º dia. Ainda na mesma tabela, verifica-se que as culturas de nºs 620, 630-7 e 630-12, só deram resultados positivos no 14º dia de crioenriquecimento, continuando a dar este mesmo resultado no 21º

dia. Já as culturas nºs 731-2 e 731-3 somente foram positivas no 21º dia de crioenriquecidas.

4.10. MORBIDADES E MORTALIDADES BOVINAS ATRIBUÍDAS POSSIVELMENTE A INFECÇÃO PELA *Yersinia pseudotuberculosis* EM FAZENDAS NO ESTADO DO PARANÁ, DURANTE OS ANOS DE 1987 E 1988

Em relação a morbidade e a mortalidade nos 12 rebanhos afetados no ano de 1987 (possivelmente atribuídas a *Yersinia pseudotuberculosis*), verifica-se na Tabela 14, que a média na faixa etária considerada como novilhos, situou-se em 10,3% e 1,0% respectivamente. Na faixa etária dos adultos, estas situaram-se em 6,7% e 2,6% respectivamente. A faixa etária considerada como bezerros não foi afetada.

Em relação ao ano de 1988, nos 19 rebanhos afetados, verifica-se na Tabela 15 que em média, a morbidade e a mortalidade na faixa etária considerada como novilhos, situou-se em 13,4% e 2,7% respectivamente. Na faixa etária dos adultos, estas situaram-se em 11,7% e 2,6% respectivamente. A faixa etária considerada como bezerros não foi afetada.

T A B E L A 1

Amostras de fezes e conteúdo intestinal, positivas e negativas para *Yersinia pseudotuberculosis*, em relação ao total de amostras analisadas em casos de diarréia bovina, durante os anos de 1987 e 1988 (no Estado do Paraná).

Material analisado	Amostras				Total	
	Positivas		Negativas			
	Nº	%	Nº	%		
Fezes	46	21,0	174	79,0	220	
Cont. I.D.	9	15,0	51	85,0	60	
Cont. I.G.	5	9,0	51	91,0	56	
Total	60	18,0	276	82,0	336	

Símbolos:

Cont. I.D. = Conteúdo de intestino delgado

Cont. I.G. = Conteúdo de intestino grosso

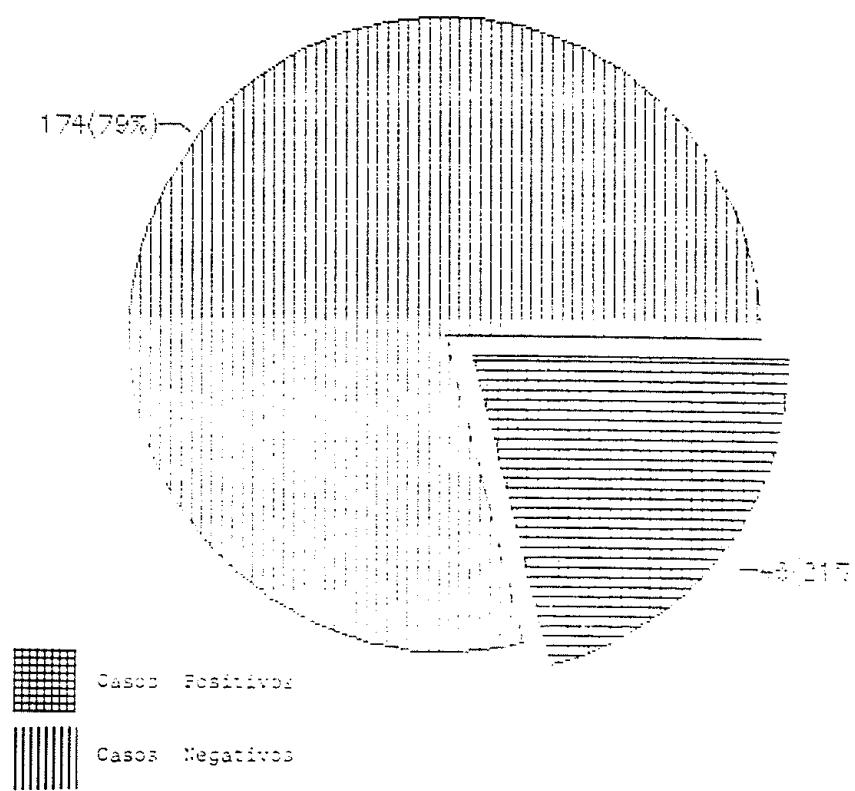


Fig. 1 - Número de amostras de fezes obtidas de bovinos acompanhados de diarréia, positivas e negativas para *Yersinia pseudotuberculosis*, durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná.

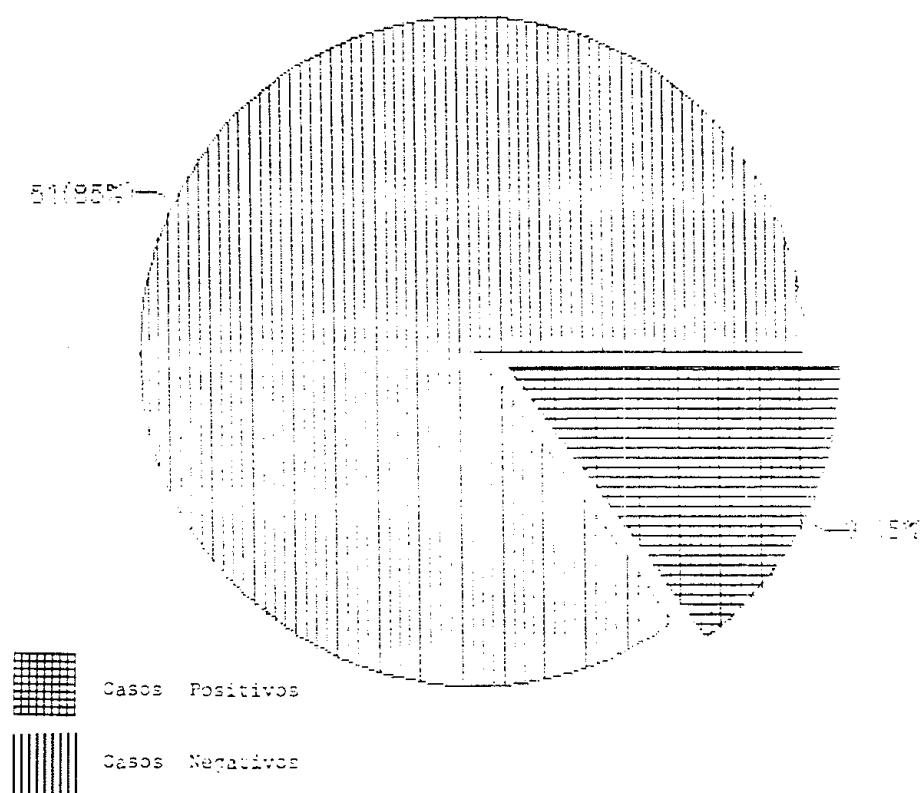


Fig. 2 - Número de amostras de conteúdos de Intestino Delgado obtidas de bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, positivas e negativas de *Yersinia pseudotuberculosis*, durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná.

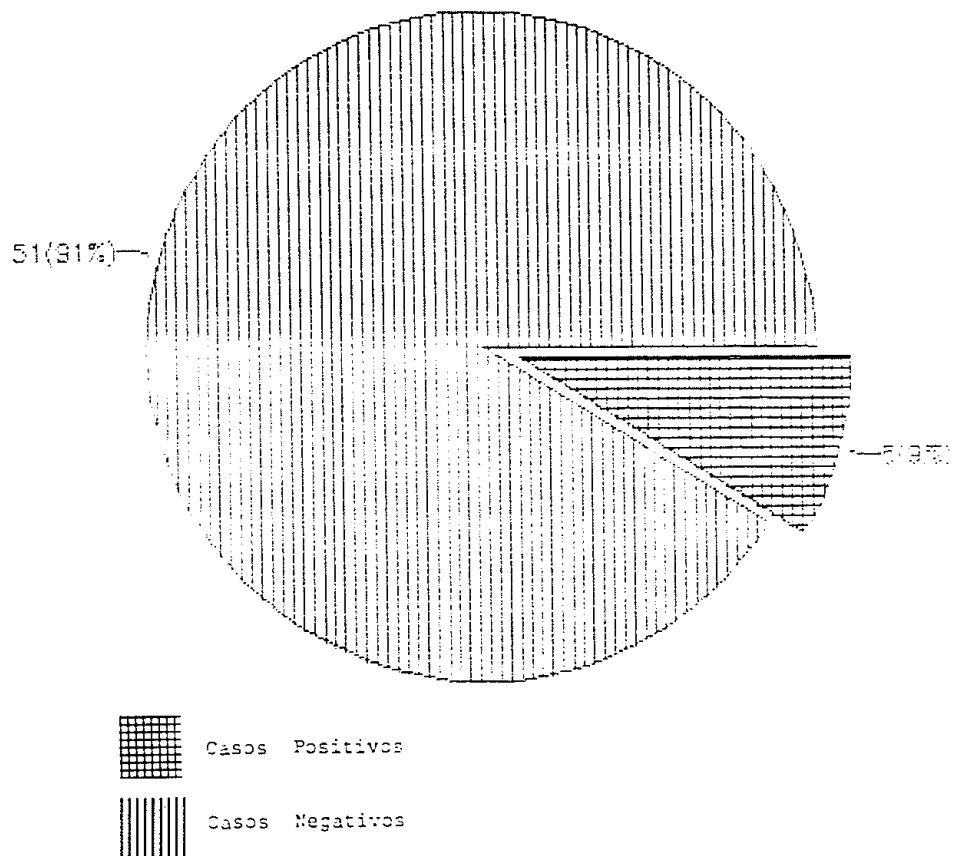


Fig. 3 - Número de amostras de conteúdos de Intestino Grosso, obtidas de bovinos que pereceram com sintomatologia diarréica, positivas e negativas para *Yersinia pseudotuberculosis*, durante os anos de 1987 e 1988, no Estado do Paraná.

T A B E L A 2

Características de sensibilidade e resistência "in vitro" das 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* pertencentes ao soro grupo O III, isoladas á partir de fezes e conteúdos intestinais de bovinos acometidos de diarréia.

Produto utilizado	Média dos halos de inibição (mm)	Sensível à partir de (mm)	Resultado considerado
Tetraciclina	27	19	S
Cloranfenicol	32	18	S
Estreptomicina	25	15	S
Gentamicina	33	13	S
Kanamicina	27	18	S
Neomicina	26	17	S
Penicilina	27	22	S
Ampicilina	36	14	S
Amicacina	34	18	S
Colistina	21	11	S
Cefalotina	40	18	S
Novobiocina	13	22	R
Nitrofurantoína	27	17	S
Sulfonamidas	-	17	R
Sulfa-Timetoprim	-	16	R
Polimixina	22	12	S

Símbolos:

S = Sensível

R = Resistente

T A B E L A 3

Resultados das sorotipagens das 25 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, isoladas durante o ano de 1987, fornecidos pelo Centro Nacional de Referência de *Yersinia*.

Nº DE ORIGEM	RESULTADOS
522/87 - Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
561/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
571/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Intestino Delgado	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
691/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Intestino Delgado	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
736/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
737/87 - Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
771/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
783/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Intestino Delgado	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
807/87 - Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 4	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 5	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
833/87 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
871/87 - Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 4	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
941/87 - Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III
- Fezes 4	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) -0:III

T A B E L A 4

Resultados das sorotipagens das 35 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, isoladas durante o ano de 1988, fornecidos pelo Centro Nacional de Referência de *Yersinia*.

Nº DE ORIGEM	RESULTADOS
424/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
483/88 - Intestino Delgado	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Intestino Grosso	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
580/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
618/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
620/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
623/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
630/88 - Fezes 7	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 12	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
631/88 - Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
642/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
656/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
657/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
660/88 - Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
670/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
702/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
727/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
731/88 - Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
734/88 - Intestino Delgado	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Intestino Grosso	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
742/88 - Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 3	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 4	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 5	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 6	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
- Fezes 7	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III
778/88 - Fezes	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-) 0:III

810/88	- Fezes 1	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-)-0:III
	- Fezes 2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-)-0:III
874/88	- Fezes 5	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-)-0:III
	- Fezes 100	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mel.-)-0:III

T A B E L A 5

Frequênciā do isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis*, pertencente ao sorogrupo O III, de fezes de cobaios, em dias subsequentes à administração oral de suspensão do mesmo microrganismo, obtida a 4°C e a 28°C.

Dias pós-infecção	Suspensão 4°C		Suspensão 28°C	
	cobaio A	cobaio B	cobaio A	cobaio B
	+	-	+	+
1	+	-	+	+
2	+	-	+ (óbito)	+ (óbito)
3	-	+		
4	-	+		
5	+	-		
6	-	+		
7	-	+		
8	-	-		
9	-	-		
10	-	-		
11	- (óbito)	-		
12		-		
13		- (óbito)		

Símbolos:

+= Isolamento positivo de *Yersinia pseudotuberculosis*

-= Isolamento negativo de *Yersinia pseudotuberculosis*

T A B E L A 6

Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis*, pertencente ao só rogrupo O III, de orgãos de cobaios, pós óbito, posteriormente a administração oral de suspensões do mesmo microrganismo obtida a 4°C e a 28°C.

Orgãos analisados	Suspensão a 4°C		Suspensão a 28°C	
	cobaio A	cobaio B	cobaio A	cobaio B
Cont. Est.	-	-	+	+
Cont. ID	-	+	+	+
Cont. IG	-	-	+	+
Fígado	+*	+*	+	+
Baço	-	-	-	-
Pulmão	-	-	-	-

Símbolos:

Cont. Est. = Conteúdo Estomacal

Cont. ID = Conteúdo Intestino Delgado

Cont. IG = Conteúdo Intestino Grosso

* = Microrganismo isolado do conteúdo purulento de abcesso hepático em cultura pura.

T A B E L A 7

Distribuição mensal das amostras bovinas, positivas e negativas para *Yersinia pseudotuberculosis* examinadas no laboratório durante o ano de 1987.

MESES	Número de casos de diarréia			
	Positivos	Negativos	Total	% de Positivos
Janeiro	-	10	10	0
Fevereiro	-	5	5	0
Março	-	11	11	0
Abril	-	4	4	0
Maio	-	5	5	0
Junho	3	3	6	50,0
Julho	5	22	27	18,5
Agosto	4	16	20	20,0
Setembro	10	23	33	30,3
Outubro	-	29	29	0
Novembro	-	7	7	0
Dezembro	-	9	9	0
Total	22	144	166	13,2

T A B E L A 8

Distribuição mensal das amostras bovinas, positivas e negativas para *Yersinia pseudotuberculosis*, examinadas no laboratório durante o ano de 1988.

MESES	Número de casos de diarréia			
	Positivos	Negativos	Total	% de Positivos
Janeiro	-	4	4	0
Fevereiro	-	4	4	0
Março	-	7	7	0
Abril	-	2	2	0
Maio	1	4	5	20,0
Junho	1	3	4	25,0
Julho	6	22	28	21,4
Agosto	21	37	58	36,2
Setembro	4	3	7	57,1
Outubro	-	4	4	0
Novembro	-	6	6	0
Dezembro	-	14	14	0
Total	33	110	143	23,0

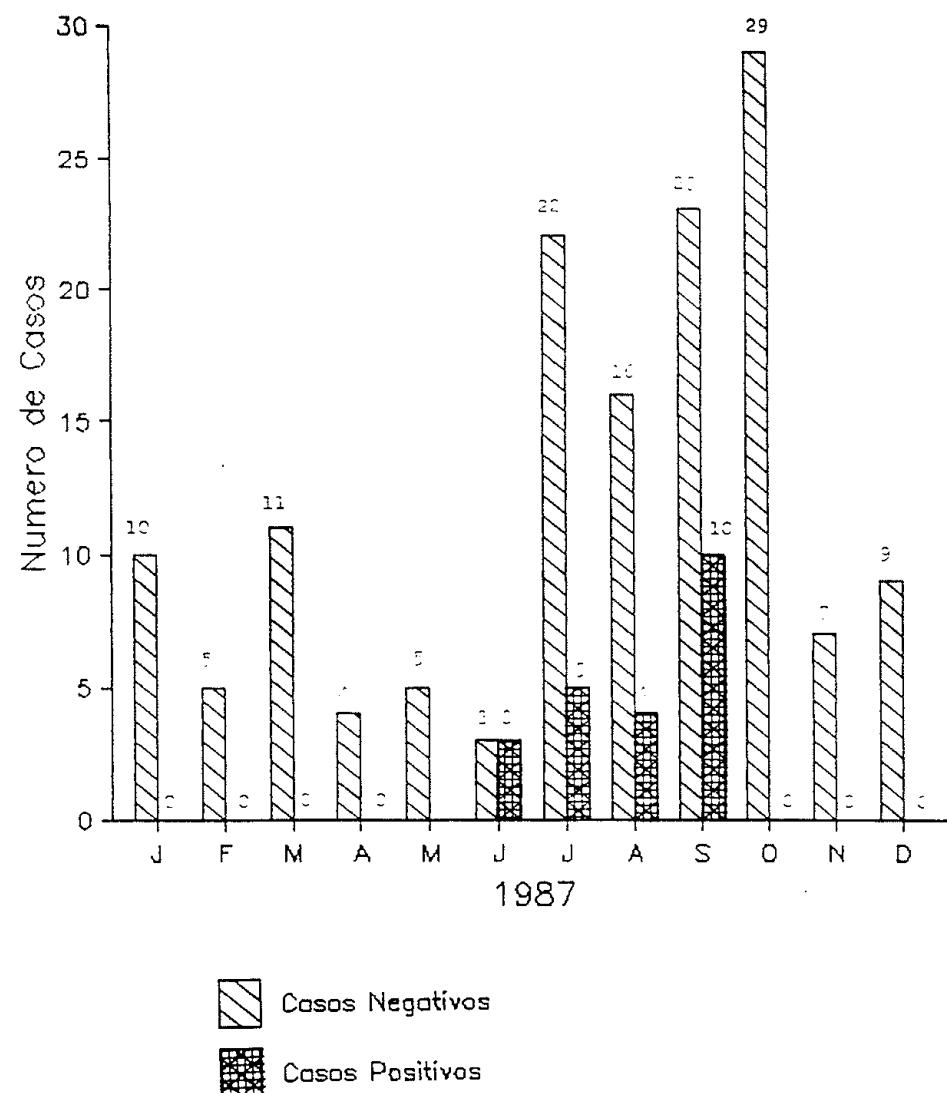


Fig. 4 - Distribuição mensal do número de casos de diarréia bovina positivos e negativos para *Yersinia pseudotuberculosis* durante o ano de 1987 no Estado do Paraná.

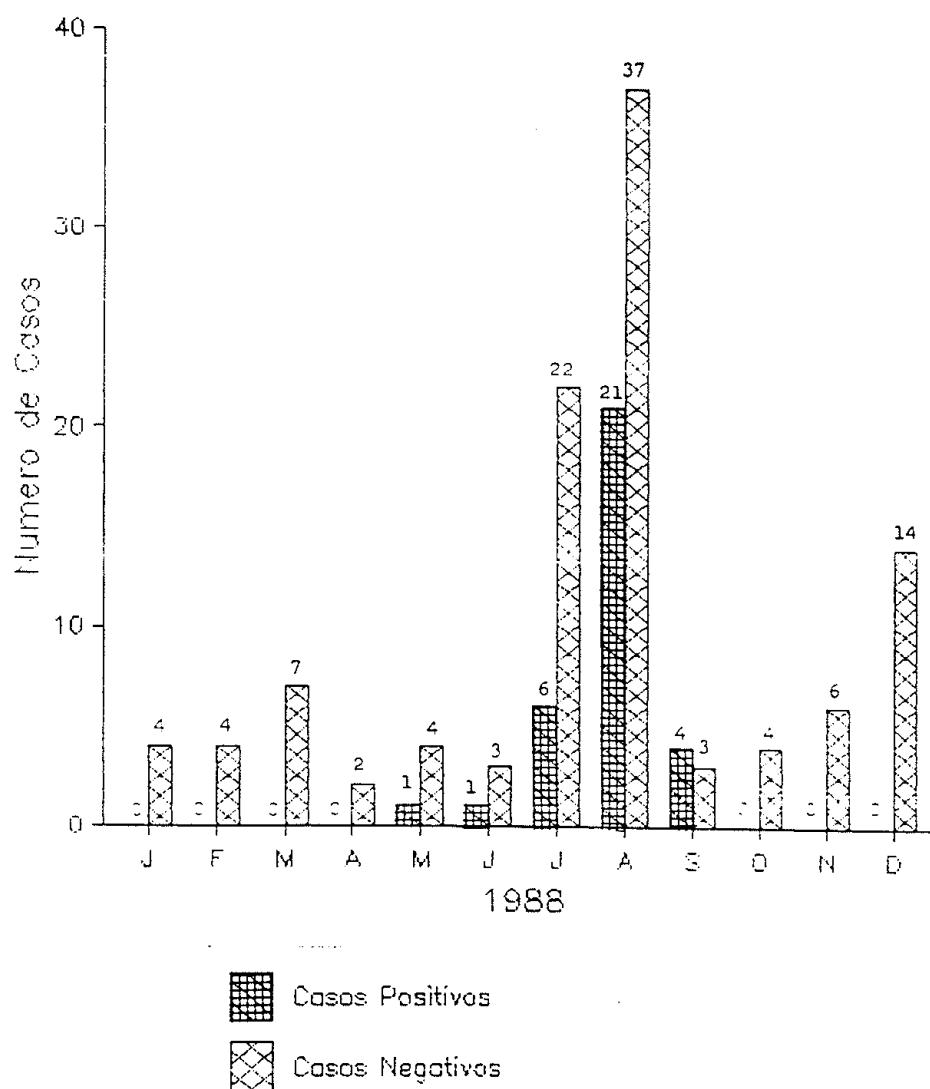


Fig. 5 - Distribuição mensal do número de casos de diarréia bovina positivos e negativos para *Yersinia pseudotuberculosis* durante o ano de 1988 no Estado do Paraná.

T A B E L A 9

Meses de ocorrência dos 22 isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* em amostras bovinas, durante o ano de 1987 no Estado do Paraná.

Propriedade	Nº casos	Registro*	Mes	Idade	Município
1	3	522-87	06	2a	Ivaiporã
2	1	561-87	07	6a	Congoinhas
3	2	941-87	07	1a	São João
4	1	833-87	07	4a	Jardim Alegre
5	1	571-87	07	2a	Nova Cantu
6	1	691-87	08	2a	Faxinal
7	2	737-87	08	2a	Ivaiporã
8	1	736-87	08	4a	Jardim Alegre
9	5	807-87	09	4a	Ivaiporã
10	1	783-87	09	6a	Toledo
11	1	771-87	09	3a	Jardim Alegre
12	3	871-87	09	4a	Jardim Alegre

* Número do protocolo do Livro de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - SEAB-Paraná.

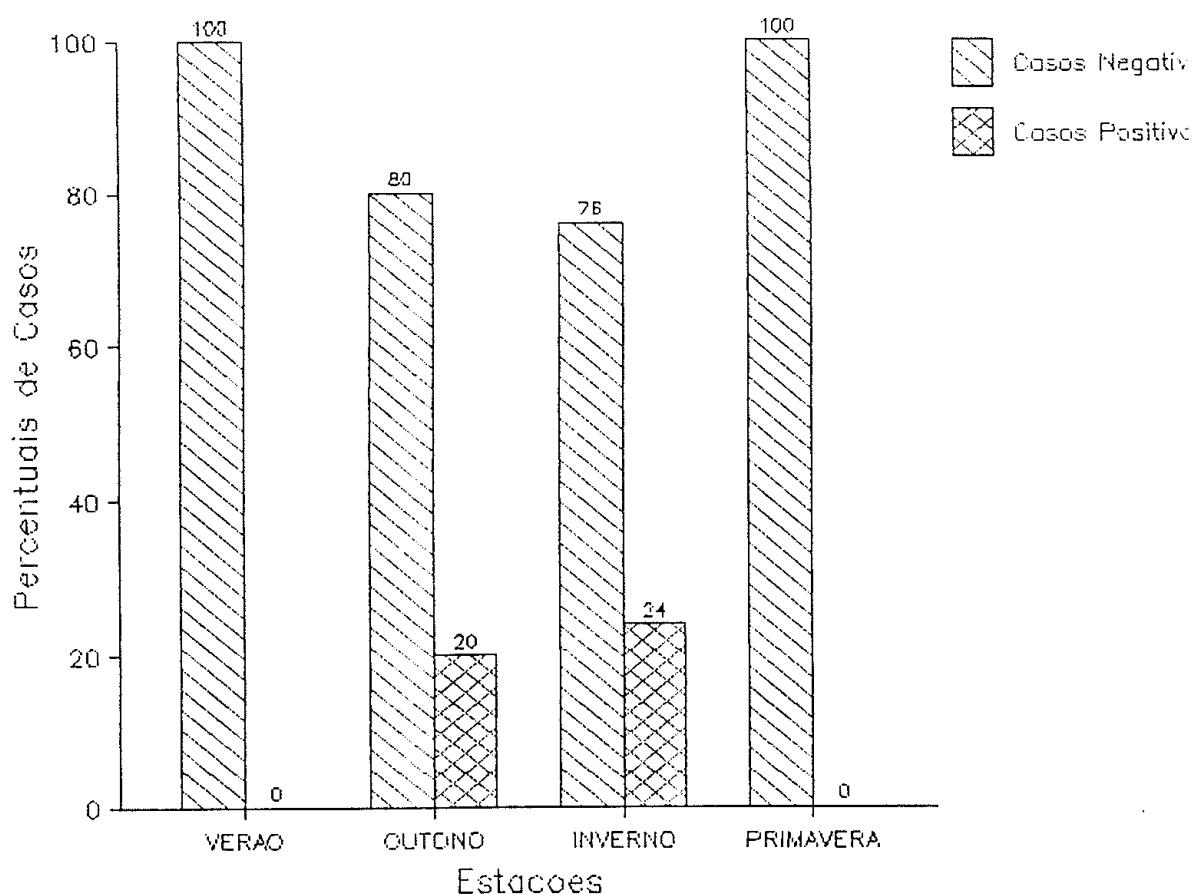


Fig. 6 - Percentuais de casos de diarréia positivos e negati
vos para *Yersinia pseudotuberculosis*, distribuídos
nas estações do ano de 1987.

T A B E L A 10

Meses de ocorrência dos 33 isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* em amostras bovinas, durante o ano de 1988 no Estado do Paraná.

Propriedade	Nº casos	Registro*	Mes	Idade	Município
1	1	424-88	05	18m	Ubiratã
	1	483-88	06	18m	Ubiratã
2	1	580-88	07	18m	Ivaiporã
3	2	660-88	07	3a	Pitanga
4	1	618-88	07	2a	Morretes
5	1	620-88	07	1a	Campo Mourão
6	1	623-88	07	8a	Faxinal
7	2	630-88	08	2a	Antonina
8	3	631-88	08	3a	Lapa
	1	642-88	08	3a	Lapa
9	1	670-88	08	2a	Braganey
10	1	702-88	08	2a	S.M. do Iguaçu
11	1	656-88	08	2a	Morretes
12	1	657-88	08	2a	Morretes
13	1	727-88	08	2a	Campina Lagoa
14	1	734-88	08	5a	Faxinal
15	2	731-88	08	6a	Bom Sucesso
16	6	742-88	08	7a	Pérola D'Oeste
17	1	778-88	08	18m	Assaí
18	2	810-88	09	3a	Cornélio Proc.
19	2	874-88	09	1a	S. Pedro Ivaí

* Número do protocolo do Livro de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - SEAB-Paraná.

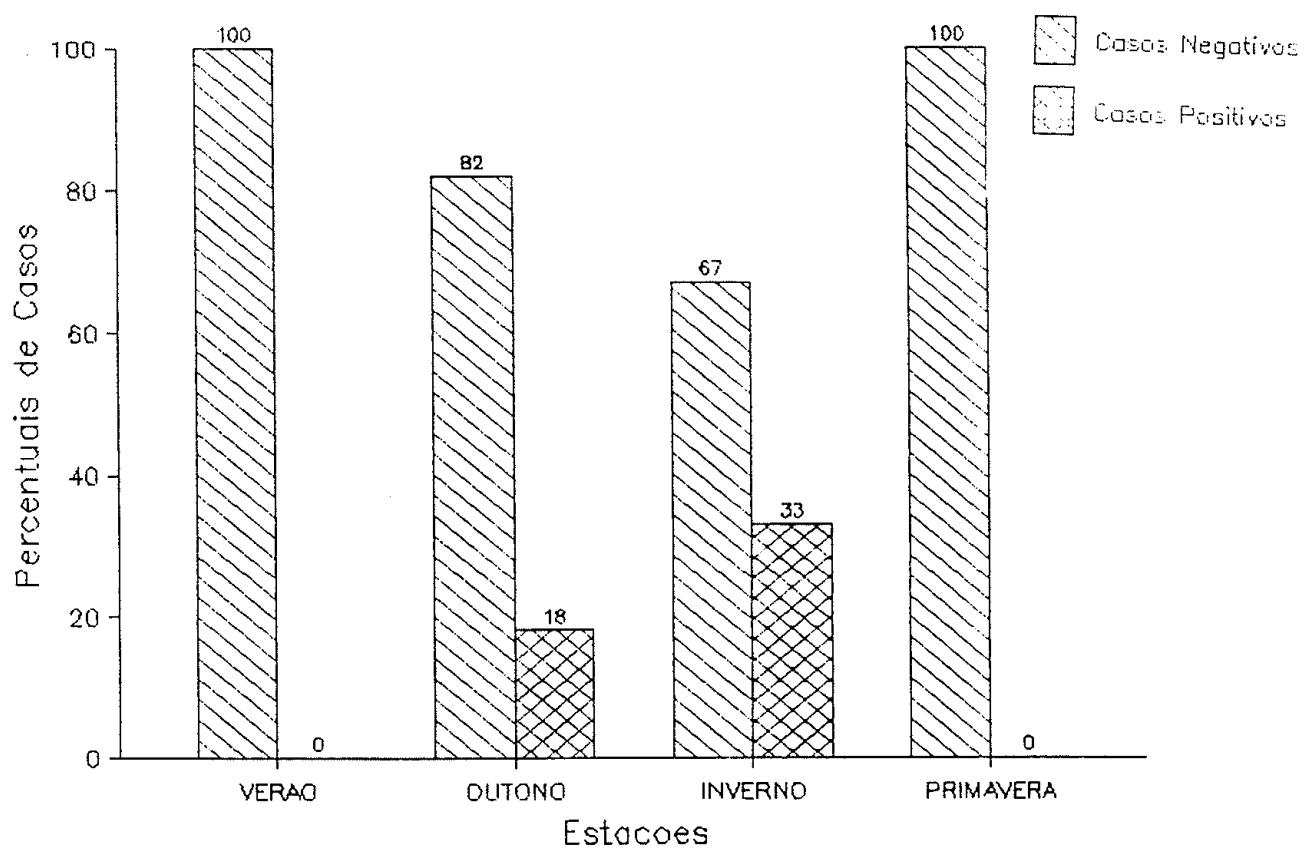


Fig. 7 - Percentuais de casos de diarréia positivos e negativos para *Yersinia pseudotuberculosis*, distribuídos nas estações do ano de 1988.

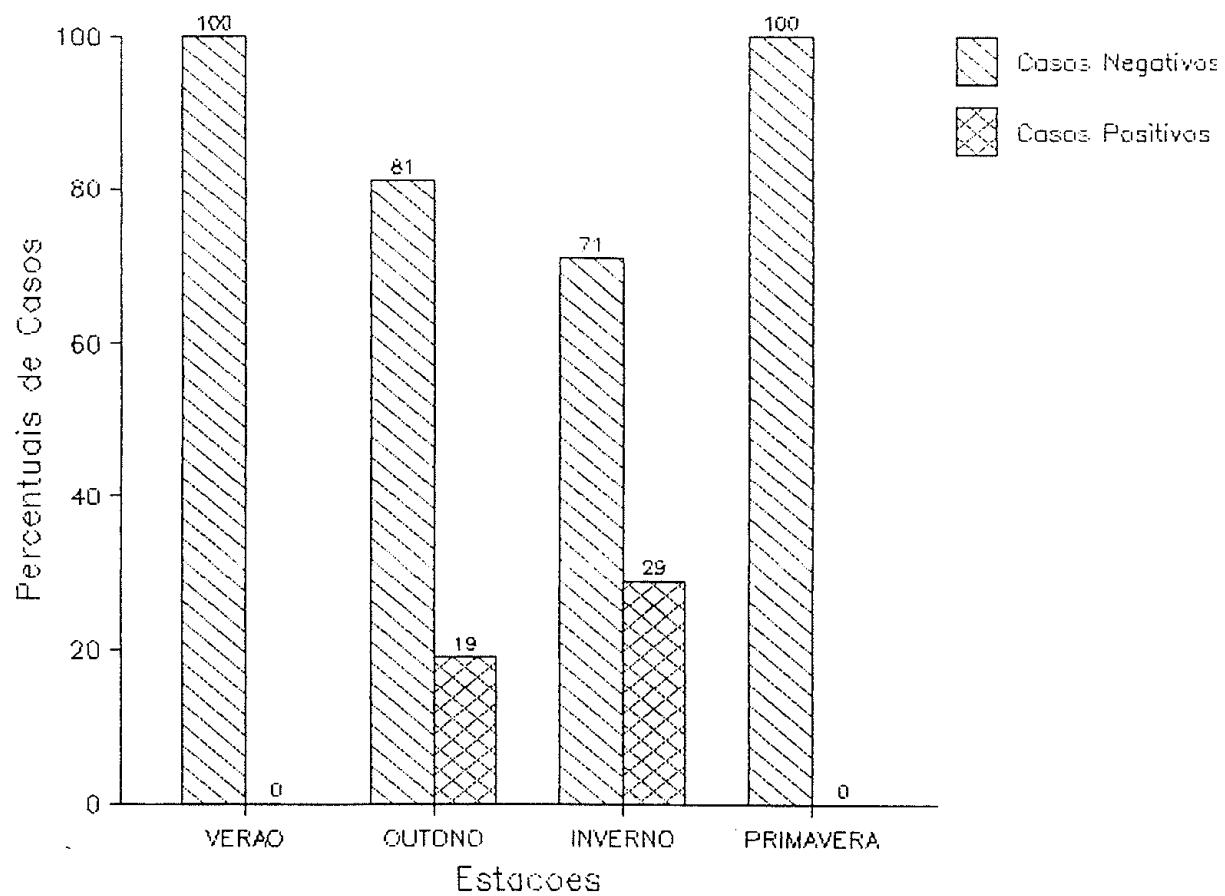


Fig. 8 - Percentuais acumulados de casos de diarréia positivos e negativos para *Yersinia pseudotuberculosis*, distribuídos nas estações dos anos de 1987 e 1988.

T A B E L A 11

Identificação taxonômica dos roedores capturados em fazendas dos municípios de Ivaiporã e Faxinal no Estado do Paraná.

Fazenda	Município	Família	Gênero	Espécie
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
1	Ivaiporã	Cricetidae	Akodon sp.	N.I.
1	Ivaiporã	Cricetidae	Akodon sp.	N.I.
2	Faxinal	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
2	Faxinal	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
2	Faxinal	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
2	Faxinal	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
2	Faxinal	Muridae	Rattus sp.	Rattus rattus
2	Faxinal	Cricetidae	Akodon sp.	N.I.
2	Faxinal	Cricetidae	Nectomys sp.	Nectomys squamipes

Símbolos:

N.I. = não identificado.

T A B E L A 12

Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* segundo a metodologia de isolamento empregada (Ano 1987).

Amostras isoladas	Plaqueamento direto			Crioenriquecimento a 4°C		
	Asa	e	MC	7º	14º	21º
522-1	+			n	n	n
522-2	+			n	n	n
522-3	+			n	n	n
561	+			n	n	n
571-F	+			n	n	n
571-ID	+			n	n	n
691-F	+			n	n	n
691-ID	+			n	n	n
736	+			n	n	n
737-1	+			n	n	n
737-3	+			n	n	n
771	+			n	n	n
783-F	+			n	n	n
783-ID	+			n	n	n
807-1	+			n	n	n
807-2	+			n	n	n
807-3	+			n	n	n
807-4	+			n	n	n
807-5	+			n	n	n
833	+			n	n	n
871-2	+			n	n	n
871-3	+			n	n	n
871-4	+			n	n	n
941-3	-			+	+	+
941-4	-			+	+	+

Símbolos:

+= Presença de *Yersinia pseudotuberculosis*

-= Ausência de *Yersinia pseudotuberculosis*

n = Não foi realizada a cultura, devido a resultado positivo no Plaqueamento direto, ou no 7º dia ou no 14º dia.

T A B E L A 13

Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* segundo a metodologia de isolamento empregada (Ano 1988).

Amostras isoladas	Plaqueamento direto Asa e MC	Crioenriquecimento a 4°C		
		7°	14°	21°
424	-	+	+	+
483-ID	+	n	n	n
483-IG	+	n	n	n
580	+	n	n	n
618	-	+	+	+
620	-	-	+	+
623	-	+	+	+
630-7	-	-	+	+
630-12	-	-	+	+
631-1	+	n	n	n
631-2	+	n	n	n
631-3	+	n	n	n
642	+	n	n	n
656	+	n	n	n
657	+	n	n	n
660-1	+	n	n	n
660-2	+	n	n	n
670	+	n	n	n
702	+	n	n	n
727	+	n	n	n
731-2	-	-	-	+
731-3	-	-	-	+
734-ID	+	n	n	n
734-IG	+	n	n	n
742-2	-	+	+	+
742-3	-	+	+	+
742-4	-	+	+	+
742-5	-	+	+	+
742-6	-	+	+	+
742-7	-	+	+	+

778	+	n	n	n
810-1	+	n	n	n
810-2	+	n	n	n
874-5	+	n	n	n
874-100	+	n	n	n

Símbolos:

+= Presença de *Yersinia pseudotuberculosis*

-= Ausência de *Yersinia pseudotuberculosis*

n = Não foi realizada a cultura, devido a resultado positivo no Plaqueamento direto, ou no 7º dia ou no 14º dia.

Asa = Agar Sangue

MC = Agar MacConkey

7º = Sétimo dia

14º = Décimo quarto dia

21º = Vigésimo primeiro dia

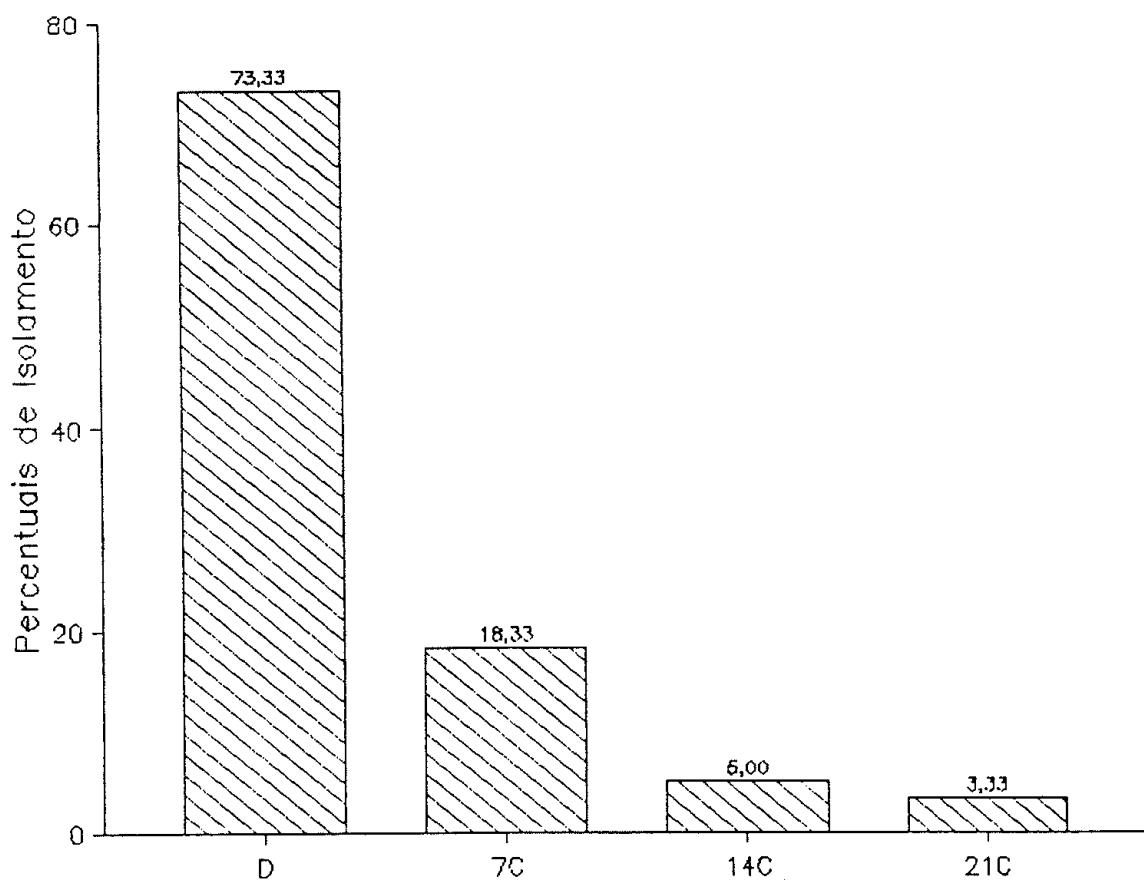


Fig. 9 - Percentuais de isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, obtidos nos cultivos primários e secundárias com 7, 14 e 21 dias de incubação a 4°C.

T A B E L A 14

Prováveis percentuais de morbidade e mortalidade bovina atribuídos a infecção entérica pela *Yersinia pseudotuberculosis*, em 12 fazendas do Estado do Paraná durante o ano de 1987.

FAZENDA Nº	Morbidade			Mortalidade			
	Bezerros		Novilhos	Novilhos	Adultos	Bezerros	Novilhos
	Bezerros	Novilhos	Novilhos	Adultos	Bezerros	Novilhos	Novilhos
1	0/1 (00,0)	0/7 (00,0)	4/12 (33,3)	0/1 (00,0)	0/7 (00,0)	(00,0)	2/12 (16,6)
2	0/159 (00,0)	0/315 (00,0)	15/300 (05,0)	0/159 (00,0)	0/315 (00,0)	15/300 (05,0)	
3	0/10 (00,0)	0/2 (00,0)	3/11 (27,2)	0/10 (00,0)	0/2 (00,0)	0/11 (00,0)	
4	0/3 (00,0)	0/5 (00,0)	4/30 (13,3)	0/3 (00,0)	0/5 (00,0)	3/30 (10,0)	
5	0/20 (00,0)	0/120 (00,0)	5/300 (01,6)	0/120 (00,0)	0/20 (00,0)	0/300 (00,0)	
6	0/4 (00,0)	-	1/4 (25,0)	0/4 (00,0)	-	0/4 (00,0)	
7	0/80 (00,0)	-	(00,0)	1/37 (02,7)	0/80 (00,0)	-	0/37 (00,0)
8	0/55 (00,0)	8/100 (08,0)	4/275 (01,5)	0/55 (00,0)	5/100 (05,0)	1/275 (00,3)	
9	0/115 (00,0)	0/135 (00,0)	4/250 (01,6)	0/115 (00,0)	0/135 (00,0)	4/250 (01,6)	
10	0/250 (00,0)	100/366 (27,3)	10/294 (03,4)	0/250 (00,0)	6/366 (0,16)	3/294 (01,0)	
11	-	-	30/250 (12,0)	-	-	19/250 (07,6)	
12	-	-	45/100 (45,0)	-	-	3/100 (03,0)	
Totais	0/697 (00,0)	108/1050 (10,3)	126/1863 (6,7)	0/697 (0,0)	11/1050 (1,0)	50/1863 (2,6)	9

T A B E L A 15

Prováveis percentuais de morbidade e mortalidade bovina atribuídos a infecção entérica pela *Yersinia pseudotuberculosis*, em 19 fazendas do Estado do Paraná, durante o ano de 1988.

FAZENDA Nº	Morbidade			Mortalidade		
	Bezerros		Novilhos	Adultos		Novilhos
				Bezerros	Adultos	Adultos
1	-	-	-	150/1000(15,0)	-	-
2	0/20 (00,0)	25/60 (41,6)	1/80 (01,2)	0/20 (00,0)	4/60 (06,6)	8/1000(00,8)
3	-	87/125 (71,9)	153/220 (69,5)	-	20/125 (16,0)	1/80 (01,2)
4	0/30 (00,0)	0/100 (00,0)	3/230 (01,3)	0/30 (00,0)	0/100 (00,0)	13/220 (06,0)
5	-	-	24/235 (10,2)	-	0/100 (00,0)	1/230 (00,4)
6	0/250 (00,0)	-	75/450 (16,6)	0/250 (00,0)	-	5/235 (02,1)
7	-	57/120 (47,5)	50/80 (62,5)	-	0/180 (00,0)	17/450 (03,7)
8	-	15/80 (18,7)	4/20 (20,0)	-	5/120 (04,1)	12/80 (15,0)
9	0/106 (00,0)	0/80 (00,0)	1/254 (00,4)	0/106 (00,0)	3/80 (03,7)	1/20 (05,0)
10	0/22 (00,0)	0/152 (00,0)	8/248 (03,2)	0/22 (00,0)	0/152 (00,0)	5/248 (02,0)
11	-	-	50/1400 (03,5)	-	-	2/1400 (00,1)
12	-	-	12/100 (12,0)	-	-	12/100 (12,0)
13	0/30 (00,0)	0/60 (00,0)	20/180 (11,1)	0/30 (00,0)	0/60 (00,0)	2/180 (01,1)
14	-	55/150 (36,6)	70/100 (70,0)	-	10/150 (06,6)	15/100 (15,0)
15	0/80 (00,0)	0/100 (00,0)	11/120 (09,1)	0/80 (00,0)	0/100 (00,0)	6/120 (05,0)
16	0/38 (00,0)	12/48 (25,0)	2/72 (02,7)	0/38 (00,0)	9/48 (18,7)	1/72 (01,4)
17	0/482 (00,0)	0/547 (00,0)	15/898 (01,6)	0/482 (00,0)	0/547 (00,0)	3/898 (00,3)
18	-	-	50/180 (27,7)	-	-	50/180 (27,7)
19	0/40 (00,0)	0/60 (00,0)	2/80 (02,5)	0/40 (00,0)	0/60 (00,0)	0/80 (00,0)
Totais	0/1098 (00,0)	251/1862 (13,4)	701/5947 (11,7)	0/1098 (00,0)	51/1862 (02,7)	155/5947 (02,6)

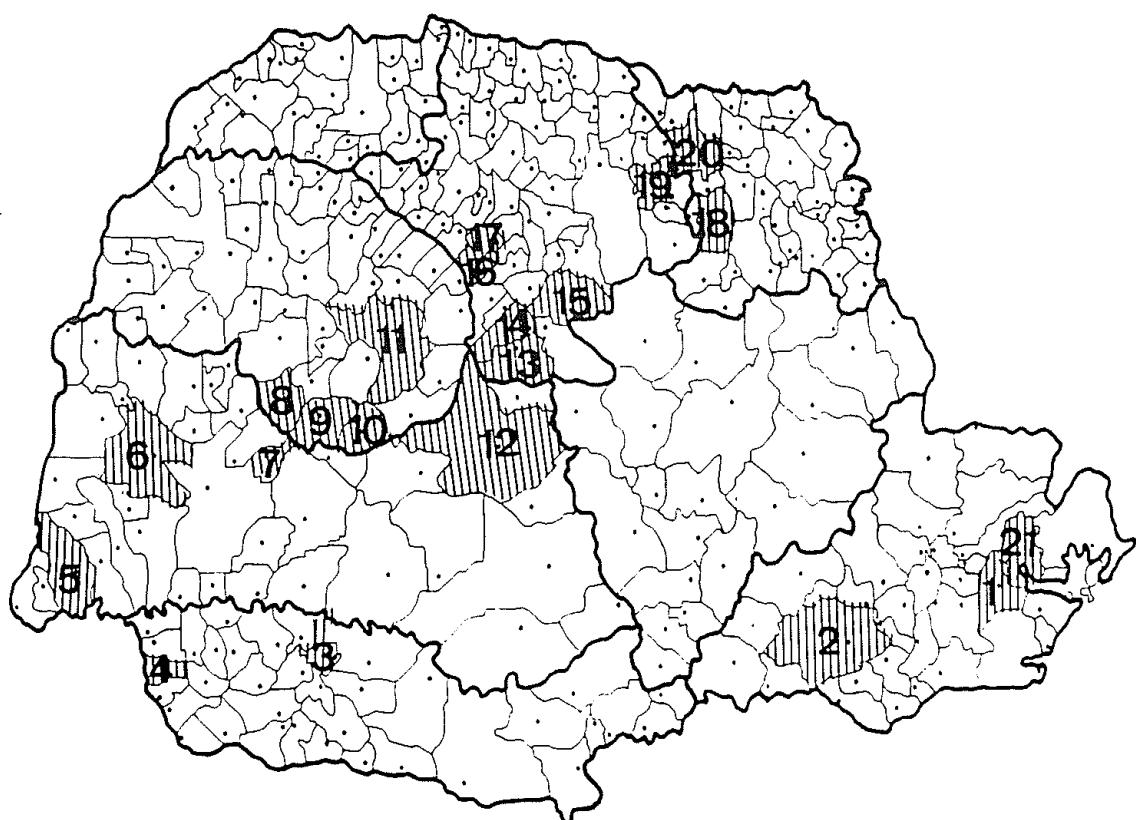


Fig.10 - Localização geográfica dos 21 municípios* do Estado do Paraná, que apresentaram animais positivos para *Yersinia pseudotuberculosis*.

* A relação dos 21 municípios paranaenses estão discriminados na Tabela 14.

T A B E L A 16

Relação dos 21 municípios do Estado do Paraná que apresentaram animais positivos para *Yersinia pseudotuberculosis* e o número de focos por município nos anos de 1987 e 1988.

Número do Mapa	Município	Número de focos
1	Morretes	3
2	Lapa	1
3	São João	1
4	Pérola D'Oeste	1
5	São Miguel do Iguaçu	1
6	Toledo	1
7	Braganey	1
8	Ubiratã	1
9	Campina da Lagoa	1
10	Nova Cantú	1
11	Campo Mourão	1
12	Pitanga	1
13	Ivaiporã	4
14	Jardim Alegre	4
15	Faxinal	3
16	São Pedro do Ivaí	1
17	Bom Sucesso	1
18	Congoinhas	1
19	Assaí	1
20	Cornélio Procópio	1
21	Antonina	1



Fig. 11 - Aspecto geral dos animais acometidos de diarréia positivos para *Yersinia pseudotuberculosis*.



Fig. 12 - Aspecto de um animal acometido de diarréia positivo para o microrganismo. Notar o estado de depauperamento geral.



Fig. 13 - Aspecto edemaciado e ulcerado da mucosa do abomaso (abomasite) de um bovino positivo para *Yersinia pseudotuberculosis*.



Fig. 14 - Aspecto das alças mesentéricas edemaciadas, apresentando petéquias na serosa bem como linfadenite.



Fig. 15 - Aspecto edemaciado e hemorrágico da mucosa do intestino grosso de um bovino positivo para *Yersinia pseudotuberculosis*.



Fig. 16 - Aspecto edemaciado da mucosa do intestino delgado de um bovino positivo para *Yersinia pseudotuberculosis*.

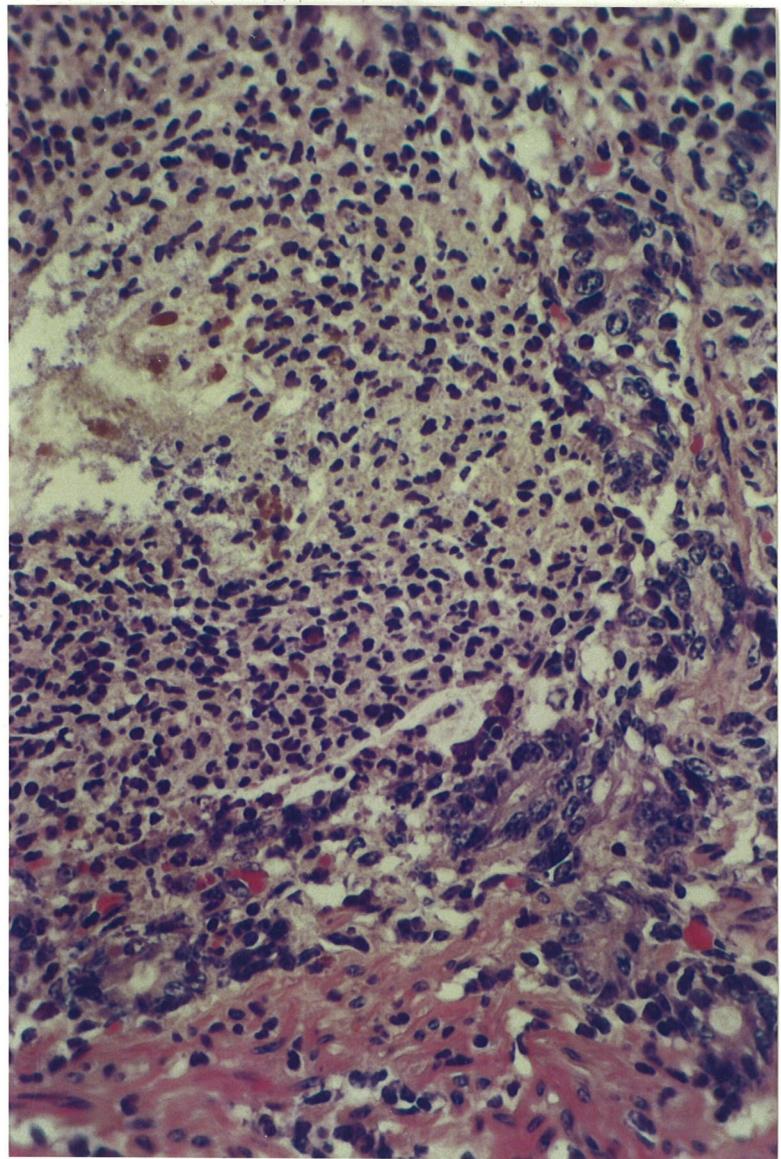


Fig. 17 - Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de um bovino (infecção natural). Microabscesso envolvendo colónia de bactérias na mucosa. H.E. 40 X.

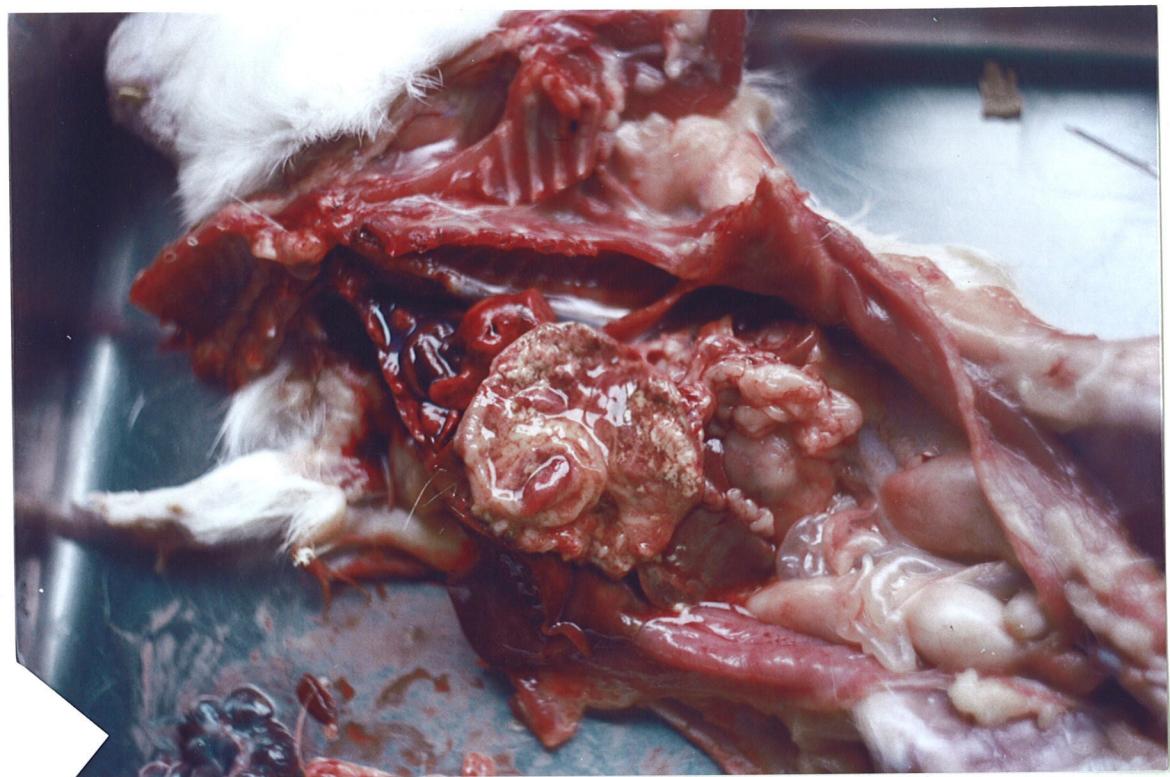


Fig. 18 - Aspecto da mucosa gástrica de um cobaio inoculado com suspensão bacteriana de *Yersinia pseudotuberculosis*, cultivada a 28°C.



Fig. 19 - Aspecto das alças intestinais de um cobaio inoculado com suspensão bacteriana do citado microrganismo cultivada a 28°C. Notar o acúmulo de líquido no interior dos intestinos.

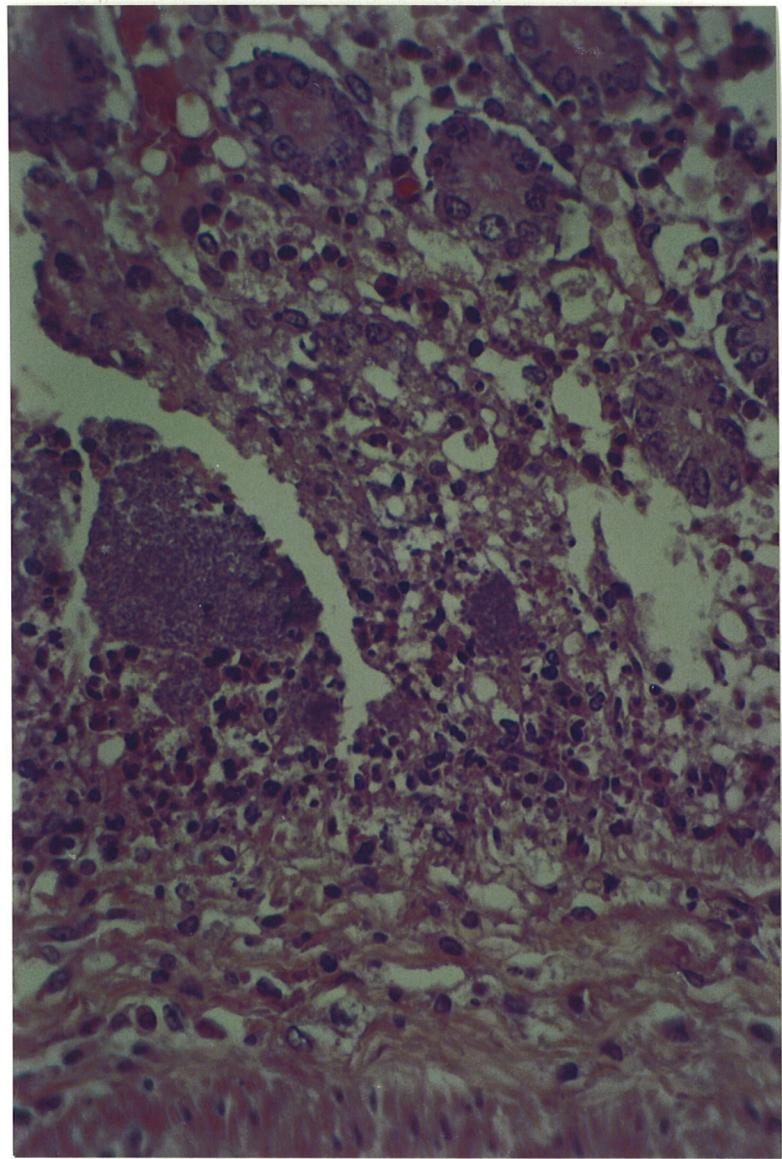


Fig. 20 - Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de uma cobaia (*Cavia cobaya*). Infecção experimental 32 horas pós-inoculação oral. Colonias de bactérias en voltas por neutrófilos (microabscesso) na mucosa.
H.E. 40 X.

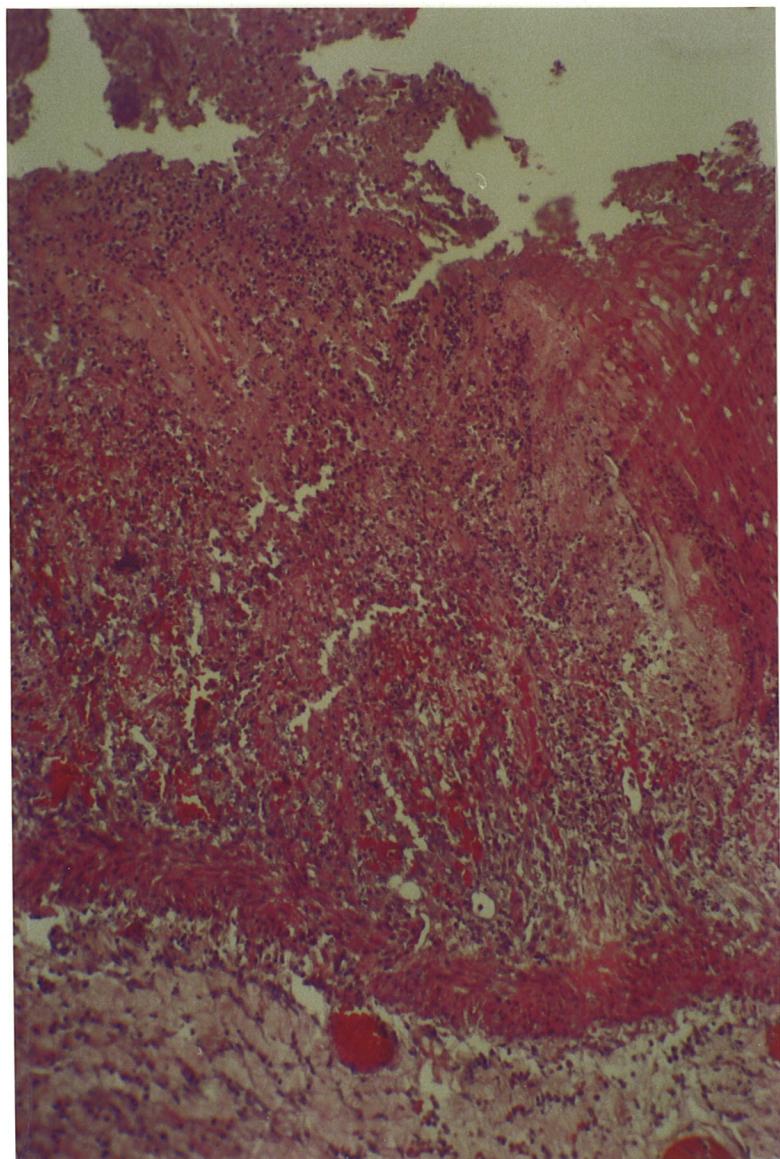


Fig. 21 - Yersiniose pseudotuberculosa. Intestino delgado de uma cobaia (*Cavia cobaya*). Infecção experimental 32 horas pós-inoculação oral. Necrose e hemorragia na mucosa com acúmulo de fibrina, neutrófilos e colônias de bactérias na superfície. Hiperemia, discreta hemorragia e infiltração inflamatória mista na submucosa. H.E. 40 X.



Fig. 22 - Aspecto da cultura de fezes positiva para *Yersinia pseudotuberculosis* no Agar Mac Conkey após 48 horas a 37°C. Notar pequenas colonias lactose negativas entre as colonias lactose positivas.

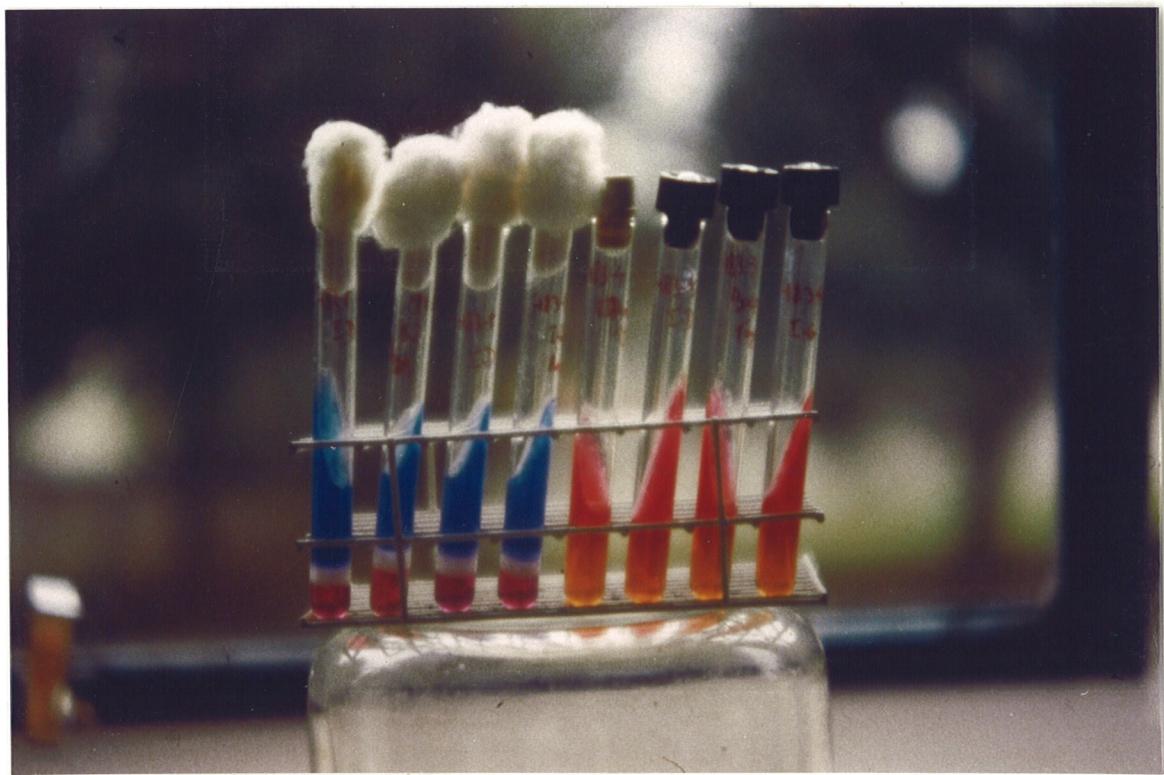


Fig. 23 - Aspecto do comportamento bioquímico da *Yersinia pseudotuberculosis* no meio presentivo de TSI e no I.A.L.

5. DISCUSSÃO

5.1. FREQUÊNCIA DE *Yersinia pseudotuberculosis* EM FEZES E CONTEÚDOS INTESTINAIS DE BOVINOS ACOMETIDOS DE DIARRÉIA

A primeira ocorrência de Yersiniose em animais no Estado do Paraná com diagnóstico bacteriológico ocorreu no ano de 1982 em búfalos. Estes animais apresentavam diarréia aquosa fétida como característica principal. Alguns animais morreram de morte súbita sem apresentar sintomatologia aparente (OLIVEIRA et alii, 1983). Posteriormente, nos anos de 1983 e 1984, ocorreram diversos surtos de diarréia bovina, com altas taxas de morbidade e mortalidade, atingindo animais com idades superiores a um ano, da raça Nelore, em fazendas de gado de corte. Os exames bacteriológicos das fezes ou dos conteúdos intestinais destes animais revelaram a presença em grande quantidade de colonias lactose negativas, pequenas e que bioquimicamente enquadram-se como *Yersinia pseudotuberculosis*. Da maioria das amostras de fezes, submetidas ao plaqueamento direto, havia um predomínio de colonias do microrganismo citado (WARTH et alii. 1984). Novos casos sucederam-se em diversos municípios deste Estado durante os anos de 1985 a 1986, totalizando a ocorrência de 22 surtos em diferentes propriedades, o que objetivou a realização do presente trabalho, durante os anos de 1987 e 1988.

Foi realizada a pesquisa de *Yersinia pseudotuberculosis* em 336 amostras bovinas, das quais 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* foram isoladas. Estas amostras eram constituídas de 220 fezes de bovinos acometidos de sintomatologia diarréica, das quais isolaram-se 46 (21,0%) cepas do citado microrganismo (Tabela 1, Figura 1). Foram também examinados 60 conteúdos de intestino delgado, apresentando-se positivos para *Yersinia pseudotuberculosis* 9 (15,0%). Também foram examinados 56 conteúdos de intestino grosso, com 5 (9,0%) de positivos para o citado microrganismo (Tabela 1, Figuras 2 e 3). Na média geral, 18,0% das amostras examinadas, continham o microrganismo pesquisado. Dos 309 bovinos acometidos de diarréia, 55 deles apresentavam *Yersinia pseudotuberculosis* em suas fezes ou em seus conteúdos intestinais, o que também dá uma percentagem de 18% de animais infectados pelo microrganismo pesquisado. Estes 55 animais infectados pertenciam a 31 propriedades distintas, localizadas em 21 municípios do Estado do Paraná (Tabelas 9, 10, 10 e Figura 10). Estes animais, em sua maioria, pertenciam a raça Nelore, com idades acima de um ano (Tabs. 9 e 10 e Figs. 11 e 12). Os animais afetados apresentavam uma profusa diarréia aquosa, muitas vezes acompanhadas de estrias de sangue. Nos poucos animais que tivemos a oportunidade de realizar uma necropsia, presenciava-se constantemente uma gastroenterite. A mucosa do abomoso apresentava-se edemaciada, com pequenas ulcerções disseminadas (Figura 13). À nível intestinal, observamos as alças mesentéricas edemaciadas, apresentando petéquias na serosa, bem como uma linfadenite mesentérica em toda a extensão do intestino delgado (Fig. 14). A luz intestinal tanto do intestino delgado como do intestino grosso,

apresentava-se com conteúdo aquoso abundante, e a mucosa apresentava-se edemaciada e hemorrágica (Figuras 15 e 16).

Quanto as lesões histopatológicas encontradas a nível de intestino delgado, observou-se, conforme mostra a Figura 17, a presença de microabscessos envolvendo colonia de bactérias na mucosa. Os intestinos, tanto o delgado quanto o grosso, mostraram necrose de vilosidades, hiperemia, hemorragia e acentuada infiltração inflamatória por mononucleares, com presença de muitos plasmócitos na mucosa e na sub-mucosa, caracterizando um quadro típico de enterite crônica. Os linfonodos mostravam depleção linfóide, severo edema principalmente na região medular e discreta hemorragia. No abomaso a alteração mais importante encontrada foi o acentuado edema na sub-mucosa.

Constatou-se portanto, um quadro de lesões muito semelhantes às encontradas por outros pesquisadores nos casos de Yersinose bovina, principalmente as necroses das vilosidades, o edema e a presença de células inflamatórias, também observadas por BEHRA et alii, 1984; CALLINAN et alii, 1988; SLEE et alii, 1988 e RIET-CORRÊA et alii, 1990. Interessante mencionar de que este quadro de lesões macroscópicas e microscópicas observadas nos casos de Yersinose pseudotuberculosa bovina são também observadas nos casos de Yersinose pseudotuberculosa em cervídeos na Nova Zelândia, onde esta doença bacteriana é considerada a mais frequente nesta espécie animal. Segundo HENDERSON (1983), as lesões observadas nestes ruminantes silvestres apresentam um quadro que varia de leve inflamação à severa enterite hemorrágica, associado com abomasites, marcado edema das alças mesentéricas e de seus linfonodos. Lesões, portanto, semelhantes as

apresentadas nas Figuras 13, 14, 15 e 16, nos casos de Yersiniose pseudotuberculosa bovina.

Ainda a este respeito, segundo SLEE et alii (1988), as lesões histopatológicas encontradas nos intestinos dos animais que sofriam de enterite por *Yersinia pseudotuberculosis* diferiram de todas as outras lesões encontradas nos casos de salmoneloses, coccidioses, criptosporidiose, febre catarral maligna e na diarréia viral bovina (BVD). Para os autores, este achado, juntamente com os resultados hematológicos e sorológicos, comprovam definitivamente de que se trata de Yersiniose pseudotuberculosa bovina e não apenas o isolamento casual do microrganismo.

Quanto aos resultados sorológicos e hematológicos observados nos casos de Yersiniose pseudotuberculosa bovina no Estado do Paraná, SUZUMURA (1984) relatou a presença de aglutininas contra *Yersinia pseudotuberculosis* do soro grupo O III em 80% dos animais testados. O quadro hemático na maioria dos animais examinados foi de uma anemia acompanhada de leucocitose com neutrófilia. Dados portanto semelhantes aos observados por SLEE et alii (1988) na Austrália.

Em trabalho publicado recentemente, FALCÃO (1987), relata que das 33 cepas de *Yersinia* sp. isoladas de animais no Brasil e tipificadas no Centro Nacional de Referência de *Yersinia* durante os anos de 1980 a 1985, 27 delas pertenciam a espécie *Yersinia pseudotuberculosis*, todas isoladas de casos de diarréia bovina no Estado do Paraná por WARTH et alii (1984) com 24 cepas e FERREIRA et alii (1985) com três. Pode-se supor, face ao exposto, de que no Brasil, até o ano de 1985, os focos com comprovado isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* concentraram-se no Estado do Paraná. No Rio

Grande do Sul, RIET-CORREA et alii (1990), descreveram a ocorrência de três surtos de diarréia acometendo búfalos nos meses de inverno. Estes surtos provocaram em média a morte de 8,2% dos bovinos adultos e 22,1% dos animais mais jovens. *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo OI foi isolada em cultura pura. Os autores citam no trabalho os isolamentos do mesmo microrganismo pertencente ao sorogrupo O III, realizados por OLIVEIRA et alii (1983), SUZUMURA (1984) e WARTH et alii (1984) no Brasil e os realizados por BEHRA et alii (1984) na Índia e por CALLINAN et alii (1988) na Austrália. Face a literatura consultada, os autores acreditam que este sorogrupo O I tenha sido pela primeira vez isolado de búfalos em nosso país.

Coincidentemente, o primeiro foco de Yersiniose pseudotuberculosa no Estado do Paraná também ocorreu envolvendo a espécie bubalina, diagnosticado por OLIVEIRA et alii (1983), no qual os animais também apresentavam diarréia aquosa fétida.

Outros episódios, associando *Yersinia pseudotuberculosis* a casos de diarréia em bovinos, búfalos e cervos, também ocorreram em outros países.

Nos estados Unidos, WETZLER & HUBBERT (1968), isolaram *Yersinia pseudotuberculosis* de um caso de pneumonia e enterite em um bezerro de três meses de idade.

HENDERSON (1983) na Nova Zelândia, relatou a ocorrência de mortes súbitas ou mortes após episódios de diarréia em cervos. À necropsia, constatou-se abomasites, enterites, linfadenites e hepatites. Das 61 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas, 9 pertenciam ao sorogrupo O III.

Também na Nova Zelândia, HODGES et alii (1984),

realizaram um trabalho de sorotipagens em 234 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de origem animal. Destas, 56 foram isoladas de bovinos. Os autores citam que estas cepas foram isoladas de animais que morreram ou que mostravam-se doentes, tendo como sintomatologia principal a diarréia.

No mesmo país, HODGES & CARMAN (1985), relataram que nos anos anteriores a 1978, *Yersinia pseudotuberculosis* foi diagnosticada neste país, principalmente em pássaros, coelhos e cobaios e raramente em ruminantes. Entretanto, entre 1978 e 1982, houve grande ocorrência em criações de cervos. De 629 casos ocorridos nestes ruminantes silvestres, 275 (43,2%) destes, foram devido ao citado microrganismo. Segundo os autores, acredita-se que esta elevada percentagem deva-se a rápida expansão do número de fazendas de criação desta espécie animal. Porém durante os anos de 1983 a 1984, ocorreram 251 casos de isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* de bovinos e nos dez anos anteriores, apenas 59 casos. Os autores não sabem se estes achados refletem uma maior incidência do microrganismo na espécie bovina ou se ocorreram melhorias técnicas nos diagnósticos realizados.

Na Índia, BEHRA et alii (1984), isolaram de búfalos com idades variando entre 6 a 9 meses, durante os meses de inverno *Yersinia pseudotuberculosis*. Os animais apresentavam diarréia e segundo os autores, face a literatura consultada, trata-se do primeiro caso de ocorrência deste microrganismo atingindo bovinos naquele país.

Na Argentina, PUEYO et alii (1987), descreveram o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* III de um bezerro com 8 a 10 meses de idade, apresentando um quadro entérico, com manifestações de diarréia. Os autores chamam a atenção

para o que eles chamam de "um caso pouco frequente de enterite purulenta em bovinos".

Na Australia, CALLINAN et alii (1988), descreveram uma síndrome de diarréia e morte em bovinos, associada a *Yersinia pseudotuberculosis*. Neste trabalho, os bovinos afetados apresentavam uma profusa diarréia, inapetência e desidratação. Foram realizados exames bacteriológicos nos órgãos de 22 animais, dos quais isolou-se 33 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, a partir de conteúdo de intestino delgado, grosso, linfonodos mesentéricos e pulmões. Os autorescreditam, face a literatura consultada, que surtos de doença entérica bovina associada a *Yersinia pseudotuberculosis* não tenham sido descritos previamente.

No mesmo país, SLEE et alii (1988), descreveram o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* de 222 bovinos (bezerros desmamados e novilhos e adultos) que apresentavam sintomatologia diarréica.

Outros trabalhos relatando o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* em fezes ou fragmentos de órgãos, foram executados a nível de fazenda ou matadouros, provenientes de bovinos aparentemente saudáveis (ZEN-YOJI et alii, 1974; CABASSI et alii, 1976; BREWER & CORBEL, 1983; FUKUSHIMA et alii, 1983; HODGES & CARMAN, 1985).

Porém, são citados trabalhos, associando *Yersinia pseudotuberculosis* a problemas clínicos em bovinos, não entéricos (MAIR & HARBOURNE, 1963; WETZLER & HUBBERT, 1968; LANGFORD, 1969; HUBBERT, 1972; MESSERLI, 1972; GELEV, 1975; DEE, 1985; JERRET & SLEE, 1989).

Verifica-se, portanto, face a literatura consultada, que são poucos os trabalhos publicados associando *Yer-*

sinia pseudotuberculosis a casos de problemas entéricos em bovinos.

A maioria dos trabalhos referem-se a ocorrência de *Yersinia pseudotuberculosis* associada a problemas reprodutivos na espécie bovina, sendo o microrganismo isolado a partir do feto ou de seus envoltórios fetais (QUEVEDO, 1934; MAIR & HARBOURNE; 1963; LANGFORD, 1969; GELEV, 1975; DEE, 1985; JERRET & SLEE, 1989).

A ocorrência deste microrganismo associado a patologias em bovinos é tão rara, que MOLLARET (1961) afirmava de que até então não havia comprovação de sua ocorrência, com certeza, em bovinos. O mesmo autor e colaboradores, no capítulo referente a *Yersinia pseudotuberculosis*, afirmam que a doença, Yersiniose pseudotuberculosa, ocorre nos herbívoros de uma maneira geral, à exceção dos bovinos e dos equinos (MOLLARET et alii, 1982). Parecer semelhante, havia em relação a sua ocorrência em cabras e ovelhas. Segundo MOLLARET & PLACIDI (1964), infecções comprovadas em cabras e ovelhas pela *Yersiniose pseudotuberculosis* são muito raras. Citam os autores que em obras de renome como "Traité de Microbiologie" e "Microbiologie Vétérinaire", estes animais bem como os herbívoros em geral, são refratários a infecção.

Face ao exposto, o encontro de *Yersinia pseudotuberculosis* em percentagens, como as do presente trabalho (18%) (Fig. 1, 2 e 3) nas fezes ou conteúdos intestinais de bovinos com sintomatologia diarréica no Estado do Paraná, conjuntamente com o quadro de lesões apresentados (macro e microscópicas), parece indicar que o microrganismo possa estar implicado no desencadeamento desta sintomatologia. A

mesma opinião é compartilhada por BEHRA et alii (1984), SUZUMURA (1984) e WARTH et alii (1984); PUEYO et alii, 1987; SLEE et alii (1988); CALLINAN et alii (1988) e RIET-CORRÊA et alii (1989), contrárias portanto, as opiniões de MOLLARET et alii (1982).

No Estado do Paraná, durante os anos de 1982 a 1986, 22 propriedades rurais distintas tiveram seus animais atingidos por problemas diarréicos, com isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* das fezes ou dos intestinos. No presente trabalho, durante os dois anos de observações, 31 propriedades em 21 municípios do Estado do Paraná (Tabela 16 e Figura 10) tiveram seus animais afetados pelo mesmo tipo de problema. Portanto, ao contrário do que ocorre nos outros lugares, o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* de casos de diarréia bovina no Estado do Paraná é uma constatação frequente e preocupante, já que o rebanho paranaense conta com aproximadamente 8 milhões de cabeças de gado, sujeitos a risco. As facilidades do transporte rodoviário de animais de um Estado a outro podem facilitar a difusão desta doença infecto-contagiosa tornando o quadro ainda mais preocupante, quando sabemos que o rebanho nacional aproxima-se das 100 milhões de cabeças.

5.2. SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

Quanto a sensibilidade apresentada pelas 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* observou-se que, as mes-

mas mostraram-se sensíveis à Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Neomicina (30 µg), Canamicina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Penicilina (10 U.I.), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Amicacina (30 µg), Colistina (10 µg), Polimixina-B (300 µg), Nitrofurantoína (300 µg). Por outro lado apresentaram resistência às Sulfonamidas (300 µg), Sulfa-Triimetoprim (25 µg) e Novobiocina (30 µg). (Tabela 2).

No Paraná, SUZUMURA (1984) e WARTH et alii (1984), não citaram as sensibilidades apresentadas pelas cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas nos surtos de diarréia. Porém, estas cepas foram testadas posteriormente, apresentando idêntica sensibilidade aos mesmos antibióticos utilizados no presente trabalho. Segundo os autores citados houve pronta resposta a antibioticoterapia (cloranfenicol e tetraciclina) instituída a nível de campo.

Na Índia, BEHRA et alii (1984), verificaram a sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos da cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, isolada de búfalos, constatando que a mesma apresentava resistência a Penicilina na concentração de 5 U.I., a Tetraciclina (10 µg), Eritromicina (10 µg) e a Sulfadiazina (200 µg). Porém apresentou sensibilidade ao Cloranfenicol (30 µg), Ampicilina (25 µg) Kanamicina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Polimixina-B (250 U.I.), Cefaloridina (30 µg), Ácido Nalidixico (30 µg), Cloxacillina (10 µg), Carbenicillin (50 µg), Colistin (50 µg), Furadantina (250 µg) e Septran (200 µg). Sensibilidade intermediária foi notada para Estreptomicina (25 µg) e Neomicina (10 µg). Verifica-se que, apesar das cepas isoladas tanto na Índia quanto no Estado do Paraná pertencerem ao mesmo sorogrupo

estas apresentaram diferenças quanto a sensibilidade e resistência frente aos antibióticos e quimioterápicos. As cepas isoladas no estado do Paraná apresentaram sensibilidade a Penicilina e a Tetraciclina, enquanto a cepa isolada na Índia apresentou resistência a estes antibióticos. Portém deve-se levar em conta que a concentração de antibióticos nos discos de Penicilina (5 U.I.) e de Tetraciclina (10 µg) utilizados por BEHRA et alii (1984) eram menores do que as concentrações desses mesmos antibióticos utilizados no presente trabalho. As quais, continham no disco de Penicilina a quantidade de 10 U.I. e no disco de Tetraciclina (30µg). Portanto, a cepa da Índia poderia apresentar mesmo comportamento frente aos dois antibióticos citados, caso as concentrações contidas nos discos fossem as mesmas.

Na Australia, SLEE et alii (1988), citaram que das 193 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas, 18 (9,4%) mostraram-se resistentes a um ou mais antibióticos ; 192 (99,5%), mostraram sensibilidade a ampicilina e a neomicina; 176 (91,2%), sensíveis a estreptomicina e as sulfonamidas e 193 (100%), sensíveis a tetraciclinas e ao trimetoprim. Segundo os autores, os animais tratados com tetraciclina ficaram curados.

Na Australia, CALLINAN et alii (1988), verificaram a sensibilidade das 30 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, constatando serem todas sensíveis ao Cloranfenicol (30µg) e a Neomicina (30µg). Vinte e nove apresentaram-se sensíveis a Ampicilina (10µg), a Furazolidona (100µg) e ao Sulfametoazole-trimetoprim (25µg). Vinte e oito apresentaram sensibilidade a Tetraciclina (30 µg), vinte e seis sensíveis a Estreptomicina (10µg) e 19 ce-

pas resistentes as Sulfonamidas (300 μ g). Portanto, não houve homogeneidade de resultados entre as cepas isoladas, como ocorreu no presente trabalho.

Segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), *Yersinia* sp. são sensíveis "in vitro" aos seguintes antimicrobianos: Tetraciclina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Gentamicina, Canamicina, Neomicina, Ácido Nalidixico e Sulfonamida ou esta última associada com Trimetoprim. No presente experimento verificamos que as 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* apresentaram-se resistentes tanto as Sulfonamidas como a associação com Trimetoprim. Os mesmos autores citam que os membros do gênero *Yersinia* apresentam resistência a Novobiocina, fato também constatado no presente trabalho.

FALCÃO (1976), verificou a sensibilidade das 49 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de origem humana e animal, concluindo que elas mostraram-se sensíveis à Sulfa-diazina, Ácido Nalidixico, Estreptomicina, Kanamicina, Gen-tamicina, tetraciclina, Cloranfenicol, Penicilina G, Ampiciliana, Carbenicilina e Cefalotina, porém com comportamento variável frente a Colistina.

TSUBOKURA et alii (1984), analisando a suscepti**bilidade** a ampicilina de 225 cepas de *Yersinia pseudotuber-culosis* isoladas de diversas espécies animais, verificaram que 182 (80,9%) delas mostraram sensibilidade a este anti-biótico.

No presente trabalho, as amostras apresentaram sensibilidade "in vitro" tanto a Tetraciclina como ao Cloranfenicol, sendo, estes antibióticos utilizados para debelar os casos de diarréia no Estado do Paraná, apresentando ótimos resultados. A diarréia cessava, logo após o tratamento.

to sem recidivas. No surto ocorrido na Australia, CALLINAN et alii (1988) e SLEE et alii, observaram que o tratamento a base de antibióticos surtiu ótimos efeitos, o que segundo os autores, responsabilizaria um envolvimento bacteriano no desencadeamento desta síndrome. Não tendo sido isolado nenhum outro enteropatógeno além da *Yersinia pseudotuberculosis*, os autores acreditam que haja uma forte evidência da sua participação no quadro clínico de diarréia. Conclusões semelhantes temos a respeito.

5.3. CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA DAS CEPAS DE *Yersinia pseudotuberculosis*

No que se refere aos sorogrupos envolvidos nos casos de diarréia bovina, as 60 cepas isoladas pertenciam ao sorogrupo O III. (Tabelas 3 e 4). As cepas anteriormente isoladas, durante os anos de 1982 a 1986, de casos de diarréia bovina no Estado do Paraná e enviadas por WARTH et alii(1984) e FERREIRA et alii (1985) conforme dados publicados por FALCÃO (1987), também pertenciam ao sorogrupo O III. Os casos de diarréia em bovídeos diagnosticados por OLIVEIRA et alii (1983) e SUZUMURA (1984), igualmente pertenciam ao sorogrupo O III.

Quanto a predominância de certos sorogrupos sobre os outros, MAIR et alii (1979), relataram que *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III causando Yersiniose nos animais tem sido raramente encontrada na Grã-Bretanha. Segundo os autores, de 1959 a 1976, de um total de 470 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de origem animal, 352 pertenciam ao sorogrupo O I; 78 ao sorogrupo O II; 26 ao sor-

grupo O III (5,5%); 8 ao sorogrupo O IV e 6 ao sorogrupo O V. No que se refere ao sorogrupo O III, destas 26, 22 foram isoladas de abortos ovinos e duas de abortos bovinos. As duas restantes foram isoladas do intestino de um suíno aparentemente sadio e outra, do intestino de um macaco capturado.

Segundo ACHA & SZYFRES (1986), *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O I é o predominante tanto nas infecções humanas quanto animais. Resultado que vem a confirmar os achados de MAIR et alii (1965) e MAIR et alii (1979).

Outro detalhe importante é quanto a ocorrência de certos sorogrups em determinados países. WETZLER & HUBBERT (1969) nos Estados Unidos, sorotiparam 19 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de origem animal, verificando que 15 delas pertenciam ao sorogrupo O I, 3 ao sorogrupo O III e 1 ao sorogrupo O II.

Na Inglaterra, MAIR (1965), descreveu o isolamento de duas cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* pertencentes ao sorogrupo O I, de origem bovina.

Segundo THAL & KNAPP (1971), o sorogrupo O VI está confinado ao Japão.

O sorogrupo O I, sub-grupo A, também foi o mais frequente nos casos de abortos bovinos (MAIR & HARBOURNE, 1963; MAIR, 1975).

No caso de mastite bovina o sorogrupo identificado foi o O II (MESSERLI, 1972).

No Japão, foi identificado o sorogrupo O II, sub-grupo B de fezes bovinas, sorogrupo que segundo os autores, foi pela primeira vez isolado no país (FUKUSHIMA et alii, 1983).

Na Itália, de um linfonodo bovino CABASSI et alii (1976) isolaram uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* pertencente ao sorogrupo O I.

Nos isolamentos ocorridos na Índia por BEHRA et alii (1984), nos Estados Unidos por HUBBERT (1972) e na Austrália por CALLINAN et alii (1988) e SLEE et alii (1988). as cepas pertenciam ao sorogrupo O III e estavam associadas a problemas entéricos em bovinos e bubalinos.

HENDERSON (1983) na Nova Zelândia, relatou que de 61 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de 57 casos clínicos em veados, 35 (57%) pertenciam ao sorogrupo O I, 17 (28%) ao sorogrupo O II e 9 (15%) ao sorogrupo O III. Não foram isoladas cepas pertencentes ao sorogrupo O IV e O V.

HODGES & CARMAN (1985), também na Nova Zelândia isolaram 134 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de amostras bovinas, das quais 125 (93,2%) foram identificadas como pertencentes ao sorogrupo O III, 6 (4,47%) ao sorogrupo O I e 3 (2,23%) ao sorogrupo O II.

Na Argentina, PUEYO et alii (1987), isolaram de um bezerro com diarréia *Yersinia pseudotuberculosis* pertencente ao sorogrupo O III.

Na Alemanha Ocidental, WEBER (1988) citou que das 227 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de animais domésticos e silvestres, 180 (79,3%) pertenciam ao sorogrupo O I, 42(18,5%) ao sorogrupo O II, e 5 (2,2%) ao sorogrupo O III. Os autores concluíram que *Yersinia pseudotuberculosis* é um microrganismo amplamente distribuído entre os animais e que não apresenta especificidade de sorotipos e hospedeiros. Neste trabalho não foram isoladas cepas de origem bovina.

Na Austrália, JERRET & SLEE (1989), citaram que das

três cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de casos de aborto bovino, uma delas foi sorotipada e pertencia ao sorogrupo O III. Os autores chamam a atenção para o fato de que este sorogrupo é muito comum em infecções entéricas bovinas no sul da Australia.

Segundo SLEE et alii (1988), diversos pesquisadores têm observado certa preponderância do sorogrupo O III de *Yersinia pseudotuberculosis* em bovinos e suínos, e raramente em pássaros, roedores e outros animais.

Ainda em relação sorogrupo O III de *Yersinia pseudotuberculosis*, SLEE et alii (1988), verificaram que 185 das 193 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* do mesmo sorogrupo isoladas de surtos de diarréia bovina na Australia, mostraram reações fermentativas atípicas em relação a melibiose e a rhamnose dando reação negativas a estas provas. Este comportamento em relação ao sorogrupo O III, já fora amplamente discutida por TSUBOKURA et alii (1984), que demonstraram que as cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* poderiam ser divididas em dois grupos baseados na fermentação ou não da melibiose. Segundo estes autores as cepas não fermentadoras da melibiose restrinham-se ao sorogrupo O III e as fermentadoras aos demais sorogrupos. Observações semelhantes foram tiradas por MAIR et alii (1979), quando verificaram que todas as 37 cepas deste sorogrupo falharam em fermentar a melibiose, mesmo após 21 dias de incubação a 30°C e a 37°C. Os autores também verificaram que as cepas dos outros cinco sorogrupos fermentaram este açúcar. Anteriormente TSUBOKURA et alii (1984), WETZLER & HUBBERT (1968), quando realizaram provas bioquímicas com cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas de mamíferos, verificaram que a cepa pertencente ao sorogrupo

grupo O III isolada de uma vaca, apresentava reações bioquímicas atípicas em relação a rhamnose, enquanto todas as outras 18 cepas fermentaram este açucar. Embora não mencionem o resultado apresentado por esta cepa em relação a melibiose, os autores citam que das 19 cepas, 17 não a fermentaram.

Verifica-se então, a ocorrência de dois sorogrupos causando diarréia ou associados a diarréias em búfalos e bovinos no Brasil. O sorogrupo O III em búfalos (OLIVEIRA et alii, 1983) e bovinos (SUZUMURA, 1984; WARTH et alii, 1984 ; FERREIRA et alii, 1985 e SARIDAKIS et alii, 1988), no Estado do Paraná e o sorogrupo O I, no Estado do Rio Grande do Sul (RIET-CORRÊA et alii, 1990).

Em relação as cepas isoladas no presente trabalho, verificou-se que todas apresentaram esta característica atípica em relação a melibiose também verificada pelos autores citados acima, conforme demonstrado nas Tabelas 3 e 4 .

5.4. PATOGENICIDADE EXPERIMENTAL A COBAIOS

Quanto a verificação da patogenicidade apresentada pelos possíveis sorogrupos isolados, escolheu-se aleatoriamente a cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* nº 734-88, já que todas as 60 cepas pertenciam a um mesmo sorogrupo (O III).

A escolha das temperaturas (28°C e 4°C) para a multiplicação do citado microrganismo baseou-se nos seguintes critérios e objetivos: Segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), em cultivos repetidos, as cepas de *Yersinia* sp. devem ser cultivadas nas temperaturas de $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$ e não a 37°C para não perderem a virulência, razão pela qual escolheu-se

a temperatura de 28°C. Já a escolha da temperatura de 4°C baseou-se nas justificativas de BERCOVIER & MOLLARET (1984), segundo as quais, a maior incidência de casos de Yersiniose pseudotuberculosa se daria nos meses mais frios do ano, pelo fato de que este microrganismo, mesmo na temperatura de 4°C, se multiplicaria nos reservatórios telúricos (MOLLARET et alii, 1982). Assim, ao escolhe-la de certa forma, estariam simulando uma situação possível a nível de campo.

Nos cobaios que receberam suspensão bacteriana cultivada a 28°C observou-se, já nas primeiras horas pós administração oral, pelos arrepiados, anorexia, tristeza e secreção ocular. As fezes colhidas neste período não se apresentavam diarréicas, mas pastosas, amolecidos, bem diferentes das fezes normais do cobaio testemunha.

Verifica-se na Tabela 5 que os dois cobaios inoculados vieram a óbito durante o 2º dia do experimento, portanto não completando as 48 horas. Um dos cobaios morreu após 32 horas do início do experimento e o outro 34 horas após. Conforme demonstrado na mesma tabela, os exames bacteriológicos das fezes destes cobaios revelaram-se positivos para *Yersinia pseudotuberculosis* já nas primeiras 24 horas após a administração oral. À necropsia, um dos cobaios apresentou severa gastroenterite (Figura 18). O outro cobaio, apesar de não apresentar gastrite, apresentou enterite (Figura 19). Conforme demonstrado na Tabela 6, isolou-se o citado microrganismo a partir dos conteúdos estomacais, intestinais (intestino delgado e intestino grosso) e do fígado. Não se obteve isolamento dos pulmões e do baço.

Quanto as lesões histopatológicas apresentadas

a nível do intestino delgado, verifica-se na Figura 20, a presença de bactérias envoltas por neutrófilos, caracterizando um microabscesso na mucosa e na Figura 21, a presença de necrose e hemorragia na mucosa com acúmulo de fibrina, neutrófilos e colonias de bactérias na superfície além de hiperemia, discreta hemorragia e infiltração inflamatória mista na sub-mucosa. Lesões estas já descritas por outros pesquisadores e compatíveis com as apresentadas nas infecções em animais por *Yersinia pseudotuberculosis* (MOLLARET, 1961; WETZLER, 1972; OBWOLO, 1976; TRENCHI et alii, 1978).

Quanto aos animais que receberam a suspensão bacteriana cultivada a 4^oC, observou-se um quadro clínico totalmente diferente do observado nos cobaios que receberam suspensão bacteriana cultivada a 28^oC. Os animais mantiveram-se sem apresentar qualquer sintoma perceptível até o 7º dia pós administração oral. Até este dia os animais vinham se alimentando normalmente e as fezes mostravam-se normais, sem alteração na sua consistência. Já no 8º dia, um dos cobaios apresentou leve diarréia, enquanto que o outro, não apresentou esta alteração. A partir deste dia os animais não se alimentaram mais e apresentaram constipação intestinal. Emagreceram rapidamente, mostravam-se com os pelos arrepiados e debilitados. No 11º dia um deles veio a óbito e no 13º dia o outro (Tabela 5). Conforme demonstrado na mesma tabela, os exames bacteriológicos das fezes destes cobaios, mostraram-se positivos no primeiro dia para um dos cobaios, enquanto que para outro, somente no 3º dia. Observa-se que houve alternâncias de resultados, ora positivos, ora negativos. Porém, à partir do 6º dia nas fezes do cobaio A, não conseguiu-se mais o isolamento do microrganismo, enquanto

que nas do cobaio B, isto só veio a acontecer no 8º dia. Observa-se também que a partir destes dias (6º e 8º), não conseguiu-se mais isolamento até o final do experimento. À necrópsia, não se observou alterações macroscópicas perceptíveis nos órgãos internos, a não ser a presença de nódulos purulentos nos fígados dos dois cobaios, dos quais isolou-se o microrganismo em cultura pura, conforme demonstrado na Tabela 4. Obteve-se também, isolamento de conteúdo do intestino delgado do cobaio B. (Tabela 6).

Nos testes de virulência com cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* são utilizados diferentes animais de laboratório e vias de inoculação (CARTER, 1975; PAI & MORS. 1978; RICCIARDI et alii. 1978; MAIR et alii. 1979; GEMSKI et alii, 1980; LAIRD & CAVANAUGH, 1980; KAPPERUD, 1980; NUNES & RICCIARDI, 1981; OKAMOTO et alii, 1981; PAI & DESTEPHANO. 1982 ; CHANG et alii, 1984; TSUBOKURA et alii, 1984).

Segundo BERCOVIER & MOLLARET (1984), a doença denominada de Yersiniose pseudotuberculosa, pode ser reproduzida experimentalmente em cobaios e camundongos via "per os". Conforme MOLLARET et alii (1982). a doença natural pode ser reproduzida pela ingestão repetida de suspensões bacterianas. Salientam os autores que uma única ingestão provoca apenas o estado de portador transitório ao passo que, inoculações repetidas, após 15 dias em média, surge a diarréia, e magreimento e morte.

No presente experimento os animais puderam ter contato com o microrganismo na água de beber, por apenas 24 horas, após as quais, foi retirada a suspensão e substituída por água potável. Apesar deste contato ter sido possível apenas no 1º dia, os animais ingeriram a suspensão varias vezes

neste dia, o que vem em parte ao encontro do que citaram MOLLARET et alii (1982), da necessidade de serem doses repetidas. Os dois cobaios que receberam suspensão cultivada a 28°C, vieram a óbito após 34-46 horas do início do experimento, revelando ser a cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, escolhida aleatoriamente patogênica para os cobaios. A rapidez com que os animais vieram a óbito sem apresentar a sintomatologia diarréica é típica das formas agudas da doença (ACHA & SZYFRES, 1977).

Ainda quanto aos cobaios inoculados, segundo ACHA & SZYFRES (1977) os surtos de Yersiniose pseudotuberculosis nas criações de cobaios geralmente ocorrem sob a forma sub-aguda. Segundo estes autores, os linfonodos mesentéricos apresentam-se tumefatos e caseosos, encontrando-se com frequência abscessos nos órgãos internos. Os animais emagrecem rapidamente e com frequência apresentam diarréia. Nesta forma, a doença pode perdurar por um mês aproximadamente. Já na forma aguda ou septicêmica, mais rara, o animal morre em poucos dias.

Os quadros clínicos apresentados pelos cobaios inoculados parecem enquadrar-se nas duas formas clínicas distintas citadas pelos autores acima. Os cobaios inoculados com a suspensão cultivada a 4°C apresentaram a forma clínica considerada sub-aguda e os cobaios que receberam a suspensão cultivada a 37°C a forma clínica aguda ou septicêmica.

Um dos motivos para a ocorrência de quadros clínicos tão distintos com uma mesma cepa bacteriana provavelmente esteja nas temperaturas escolhidas para a multiplicação do microrganismo. KAPPERUD et alii (1984), quando cultivaram uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* na temperatura de 37°C, verificaram, com o auxílio da microscopia eletrônica, a presença de apêndices semelhantes a fimbrias na superfície bacteriana. Ao cultivarem esta mesma cepa na temperatura de 22°C, estes apêndices já não estavam presentes. Embora a sua produção seja mediada por plasmídeo, a sua expressão fenotípica só se manifesta em determinadas temperaturas de cultivo. Este fenômeno também acontece com a capacidade autoaglutinante deste microrganismo. Segundo estes autores, é possível que estes apêndices desempenhem um papel semelhante ao desempenhado pelas fimbrias da *E. coli*.

Talvez a falta destes apêndices é que tenham impossibilitado a fixação da cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* cultivada a 4°C nas células epiteliais do intestino delgado dos cobaios, não produzindo assim o quadro entérico.

Porém esta cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* cultivada a 4°C também mostrou ser patogênica para os cobaios. Ambos animais também morreram com quadros clínicos de caquexia e emagrecimento, apresentando abscessos hepáticos, típicos da Yersiniose pseudotuberculosa dos roedores conforme já citado por MOLLARET et alii (1982). Segundo estes autores, na reprodução experimental da doença, após 15 dias em média, surgem quadros de diarréia, emagrecimento e morte, revelando a necropsia abscessos mesentéricos bem como microabscessos no fígado, baço, pulmões e rins.

A presença de abscessos internos em cobaios, tam-

bém foram constatados por diversos pesquisadores (SAUTU RIES TRA, 1930; QUEVEDO, 1934; ECHEIQUE & SOSA DE CARUSO, 1959; SCHNEIDER, 1968; HUBBERT, 1972; LANGFORD, 1972a; WETZLER, 1972; MAIR et alii, 1975; RUSSEL & SCHILLING, 1976; FUROWICZ et alii, 1978; MOLLARET et alii, 1982; ROJAS et alii, 1982; NOSEDA et alii, 1987; PERFUMO et alii, 1987; PUEYO et alii, 1988). Historicamente verifica-se que esta espécie de *Yersinia* só recebeu a denominação de *Yersinia pseudotuberculosis*, justamente por causar nos animais e no homem, abscessos que lembram a lesão tuberculosa.

Ainda quanto a rapidez com que os cobaios vieram a óbito (cobaios que receberam suspensão cultivada a 28°C) sem apresentar sintomatologia típica de diarréia, verificou-se, a nível de campo, um quadro clínico semelhante acometendo os bovinos nos surtos ocorridos no Estado do Paraná. Segundo SUZUMURA (1984), de 170 animais enfermos, 10 tiveram mortes súbitas, sem apresentação de sintomatologia diarréica típica do quadro de Yersiniose bovina neste Estado. CALLINAN et alii (1988) na Austrália, verificaram que a maioria dos bovinos acometidos da doença apresentavam como sintomatologia comum a letargia, inapetência, desidratação e profusa diarréia. Porém os autores citam que alguns animais foram achados mortos sem apresentar qualquer sintomatologia.

Também na Austrália, SLEE et alii (1988), verificaram o fenômeno de morte súbita em 92 (41,4%) dos 22 animais afetados pela *Yersinia pseudotuberculosis*.

Verificou-se também, nos históricos enviados por colegas médicos veterinários de campo, o fenômeno de "morte súbita" em animais sem apresentação da diarréia aquosa. Provavelmente, estas cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* sor-

grupo O III sejam muito virulentas tanto para os bovinos quanto para os cobaios. Os mecanismos de virulência destas cepas, deveriam ser pesquisados à semelhança do que se faz com *E. coli* enterotoxigênicas.

5.5. OCORRÊNCIA DOS CASOS DE DIARRÉIA BOVINA COM ISOLAMENTO DE *Yersinia pseudotuberculosis* NOS MESES MAIS FRIOS DO ANO

Comprovou-se estatisticamente conforme já citado, associação entre os isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* dos casos de diarréia bovina e a ocorrência dos mesmos nos meses mais frios dos anos de 1987 e 1988. Verificou-se no ano de 1987 a ocorrência de 19 casos distribuídos nos meses de julho, agosto e setembro (meses invernais) e 3 casos no mês de junho (outono) (Tabela 7 e Figura 4). No ano de 1988, ocorreram 2 casos distribuídos nos meses de maio e junho (outono) e 31 casos distribuídos nos meses de julho e agosto e setembro (meses invernais) (Tabela 8 e Figura 5). No total, durante os dois anos observados, ocorreram 55 casos de diarréia bovina com isolamento do referido microrganismo, sendo que 5 (9%) no outono e 50 (91%) nos meses invernais. Verifica-se por conseguinte, que não houveram isolamentos de *Yersinia pseudotuberculosis* dos casos de diarréia bovina que ocorreram nos outros meses do ano.

No Estado do Paraná, estes meses de inverno caracterizam-se pela ocorrência de poucas chuvas, temperaturas baixas, geadas frequentes, com a consequente diminuição do crescimento vegetativo das pastagens, período em que os animais mais se ressentem da falta de alimento. A Yersiniose

pseudotuberculosa é uma doença infecciosa, contagiosa, cuja ocorrência varia conforme as estações do ano sendo mais alta durante as mais frias (MAIR, 1975; OBWOLO, 1976; BERCOVIER & MOLLARET, 1984).

Segundo MAIR (1973), entre as principais causas estressantes para os animais o frio e a fome, assumem um papel importante.

Segundo MOLLARET (1961), na França a doença ocorre com mais frequência durante os meses mais frios e úmidos, durante os quais ocorrem epizootias.

MOLLARET (1968), em 13 anos de observações sobre casos de Yersiniose pseudotuberculosa em lebres na França, verificou que a grande maioria dos mesmos ocorreu nos meses mais frios do ano.

BORST et alii (1977), na Irlanda do Norte, após 18 anos de observações sobre os casos de Yersiniose pseudotuberculosa em pássaros, verificaram uma maior incidência dos mesmos, nos meses de inverno.

Na Argentina PUEYO et alii (1987), isolaram uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis*, durante um experimento realizado nos meses de inverno, num grupo de animais que apresentavam estado nutricional deficiente e recebiam alimentação forrageira de baixa qualidade. À necropsia, este bezerro ~~doente~~ positivo apresentou intensa parasitose gastrointestinal.

Na Inglaterra, OBWOLO (1976), em levantamento dos casos de Yersiniose pseudotuberculosa durante 19 anos no Zoo de Bristol, verificou que a incidência dos mesmos foi maior durante os meses mais frios do ano, tratando-se portanto de uma doença de ocorrência sazonal. O autor atribui a maior ocorrência neste período ao stress causado pelo frio.

Quanto aos casos de Yersiniose pseudotuberculosa em búfalos, bovinos e outros ruminantes, verifica-se que os autores também mencionam a sua ocorrência nos meses de inverno. Analisando cada caso individualmente:

Na Índia, BEHRA et alii (1984), relataram que o surto de diarréia em bubalinos ocorreu durante os meses de inverno.

Na Nova Zelândia, HENDERSON (1983), verificou que os cervos capturados em seus ambientes naturais e submetidos a fatores estressantes nas fazendas de criações destes animais como adaptação a novas dietas, diminuição de pastos durante os meses de inverno, frio e verminose, apresentaram maior susceptibilidade a esta doença.

Também na Nova Zelândia, HODGES & CARMAN (1985) , relataram que a maioria dos casos clínicos de Yersiniose pseudotuberculosa em ruminantes foram diagnosticados durante os meses mais frios do ano. No experimento realizado nos meses de inverno, em que foram analisadas fezes de bovinos aparentemente sadios, verificou-se que 26,3% das mesmas continham o microrganismo. Os autores mencionam que se o mesmo experimento fosse realizado nos meses mais quentes do ano, possivelmente a percentagem de positivos seria menor.

Na Austrália, CALLINAN et alii (1988), verificaram em três anos de estudo, que a síndrome diarréica bovina foi verificada durante os meses de inverno e início de primavera. Os autores mencionam que os animais afetados tinham acesso a pastagens pouco drenadas e alagadiças, devido as chuvas que ocorrem neste período.

No mesmo país, SLEE et alii (1988), verificaram que a grande maioria dos 185 casos de Yersiniose pseudotuber-

culosa bovina ocorreram nos meses de inverno e início da primavera e poucos casos no verão e outono, quando segundo os autores, ela raramente ocorre. Ainda a respeito da incidência sazonal verificada, os autores acreditam que esta, não dependa apenas da maior susceptibilidade dos bovinos ao microrganismos nestas épocas do ano, mas também da capacidade da *Yersinia pseudotuberculosis* de sobreviver em ambientes frios e úmidos.

No mesmo país, JERRET & SLEE (1989), isolaram em três ocasiões distintas três cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* associada a problemas reprodutivos. Uma destas amostras foi isolada durante o verão e as duas restantes durante os meses de inverno.

Os surtos ocorridos no Estado do Paraná, diagnosticados por OLIVEIRA et alii (1983), SUZUMURA (1984), WARTH et alii (1984) e FERREIRA et alii (1985) também ocorreram durante os meses de inverno e início de primavera.

No Estado do Rio Grande do Sul, RIET-CORRÉA et alii (1990) mencionaram que os surtos ocorridos no município de Pelotas, ocorreram durante os meses de agosto e setembro, quando as condições físicas dos animais não eram boas, devendo a insuficiência de forragens naquela época do ano.

Portanto, os isolamentos de cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* associados a casos de diarréia bovina no Estado do Paraná, nos meses de inverno, também estão de acordo com o que diz a literatura especializada a respeito da Yersiniose pseudotuberculosa.

5.6. ENVOLVIMENTO DE ROEDORES NA TRANSMISSÃO DO MICRORGANISMO AOS BOVINOS

A pesquisa de *Yersinia pseudotuberculosis* à par-

tir de conteúdos intestinais de roedores capturados resultou negativa. Foram realizados exames bacteriológicos em 30 amostras, sendo 15 conteúdos de intestino delgado e 15 conteúdos de intestino grosso. Apesar dos resultados negativos, face ao reduzido número de espécies capturadas e de amostras estudadas, a hipótese de envolvimento destes roedores na transmissão deste microrganismo aos bovinos não ficou descartada. Verifica-se na Tabela 11, que os roedores capturados, pertenciam taxonomicamente a duas Famílias diferentes (*Muridae* e *Cricetidae*) e a três gêneros distintos (*Rattus* sp., *Akodon* sp. e *Nectomys* sp.). Estes foram capturados em duas fazendas que apresentavam na ocasião bovinos com sintomatologia diarréica, com isolamento positivo de *Yersinia pseudotuberculosis* a partir de fezes ou de conteúdos intestinais destes. O roedor mais frequentemente capturado nas cercanias das instalações, considerado "comensal", foi o *Rattus rattus*. Tal frequência de captura (11 roedores), já era de se esperar, pois esta espécie é cosmopolita, considerada problema a nível mundial, devido as perdas que ocasiona principalmente no armazenamento de grãos. Por outro lado, a captura de roedores considerados "silvestres" se reveste de maior dificuldade, principalmente devido a falta de informações a respeito destes animais, no que diz respeito a seus hábitos alimentares, habitat, espécies mais frequentes em determinadas regiões, etc... Estas dificuldades já foram enfrentadas por outros pesquisadores.

BALTAZARD (1968), no nordeste do país, quando realizava capturas de roedores possivelmente incriminados na transmissão da *Yersinia pestis* ao homem, assim relatou:

Fileiras de armadilhas de vários quilometros de comprimento foram estendidas através da caatinga, ao longo das veredas de vaqueiros entre os raros sítios existentes na região árida; essa captura prosseguiu durante um mês e meio, sob a forma de sondagens que cobriram mais de cem quilometros quadrados: nenhum roedor foi capturado.

Neste trabalho de captura, obteve-se três roedores do gênero *Akodon* sp. e um da espécie *Nectomys squamipes* todos considerados "silvestres".

No que diz respeito a importância da Yersiniose pseudotuberculosa entre os roedores encontram-se numerosos trabalhos nesta área.

RUSSEL & SHILLING (1976), consideram a Pseudotuberculose uma enfermidade transmitida por roedores silvestres, atingindo em maior número, os coelhos silvestres (lebre) do que os de laboratório. Segundo os mesmos autores, os coelhos de laboratório geralmente se contagiam pela contaminação de alimentos e águas com fezes destes roedores.

Segundo MAIR (1973), tanto na França como na Alemanha, dentre os animais silvestres, as lebres são os mais atingidos, sendo o microrganismo isolado em mais de 60% dos casos.

Na França, Alemanha e Suiça, *Yersinia pseudotuberculosis* é a maior responsável pela morte de leporideos do que qualquer outra causa bacteriana (MOLLARET et alii. 1982).

WETZLER (1972), citou 23 diferentes espécies de roedores dos quais isolou-se *Yersinia pseudotuberculosis*, incluindo entre as atingidas, o *Rattus norvergicus* e o *Rattus rattus*.

Na Suíça, SCHNEIDER (1968), realizou um levantamento de 10 anos (1957 a 1966) sobre a ocorrência de casos de Pseudotuberculose entre os animais do país, enumerando 163 ocorrências, demonstrando que a lebre comum foi a espécie mais frequentemente atingida com 100 casos; o coelho doméstico com 19 casos; os cobaios com 6 casos e o *Rattus norvegicus* com 1 caso.

Na Inglaterra, OBWOLO (1976) em outro levantamento abrangendo os anos de 1955 a 1974 no zoo da cidade de Bristol, entre os 91 casos de Pseudotuberculose, 72 ocorreram em pássaros; 17 em primatas; 1 caso em carnívoro e 1 caso em um roedor da espécie *Hidrochoerus hicroaeris*, conhecido em nosso país com o nome vulgar de capivara.

KAPPERUD (1977), procurando detectar os possíveis reservatórios de *Yersinia enterocolitica* em roedores como fator de risco para saúde pública na Dinamarca, isolou 31 cepas de *Yersinia enterocolitica* em 305 amostras fecais de pequenos roedores, e três cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* pertencente ao sorogrupo O II B em roedores da espécie *Clethrionomys glareolus*.

Segundo MOLLARET (1961), a Pseudotuberculose afeta espontaneamente uma quantidade de espécies, mas com maior predileção pelos roedores e entre estes, a lebre e o cobaio. Segundo o autor, entre 438 cepas chegadas ao laboratório, 191 (43,6%) delas foram isoladas de lebres, constituindo-se a doença bacteriana mais comum nesta espécie.

Na Russia, ULYANOVA (1961), com o objetivo de verificar quais as espécies envolvidas na transmissão da Pseudotuberculose, examinaram bacteriologicamente 20.000 roedores e outros animais do distrito de Leningrado, obtendo 37 i

solamentos de *Yersinia pseudotuberculosis*, incluindo entre as espécies de roedores o *Rattus norvergicus*, *Mus musculus* e o *Apodemus agrarius*.

Na Califórnia, BUHLES et alii (1981), procurando estudar as causas de um surto epizoótico de Pseudotuberculose atingindo uma colônia de macacos (*Saimiri sciureus*), capturaram 83 roedores nos arredores da criação. Destes, 53 pertenciam as espécies *Mus musculus* e 27 a espécie *Peromyscus maniculatus*. Em três destes roedores da espécie *Mus musculus*, foi isolado o microrganismo a partir do conteúdo cecal dos mesmos.

No Brasil, HÖFER et alii (1979), examinaram fragmentos de fígado, baço e fezes, colhidas de 136 roedores silvestres capturados no município de Friburgo (considerado foco silente de Peste Bubônica), isolando 4 cepas de *Yersinia* sp., sendo 3 destas pertencentes a espécie *Yersinia enterocolitica* e uma pertencente a espécie *Yersinia pseudotuberculosis*, isolada do fígado de uma preá (*Cavia aperea azarae*, Lich).

Na disseminação da doença nas criações de bovinos no Estado do Paraná, as lebres poderiam ser os animais incriminados, já que em certos países da Europa vem a ser a espécie de roedor mais frequentemente afetada, como já foi citado anteriormente. Porém, o que ocorre nas lebres das regiões europeias são verdadeiras epizootias da doença, fato que não ocorre em nosso país, face a literatura consultada.

Ainda em relação aos roedores, interessante se faz ressaltar que na segunda edição do livro "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales", ACHA & SZYFRES (1986), ampliaram as possibilidades

no que diz respeito as fontes de infecção e modos de transmissão desta zoonose. Segundo estes autores, face a enorme gama de espécies de animais afetadas, supõe-se que os animais de uma maneira geral e não só os roedores constituem os reservatórios deste microrganismo. Percebe-se que houve uma mudança radical na visão destes autores no que se refere aos reservatórios. Visão semelhante a este respeito foi mencionada por CALLINAN et alii (1988), quando da ocorrência da diarréia bovina por *Yersinia pseudotuberculosis* na Austrália. Segundo aos autores, os próprios bovinos poderiam ser os portadores do microrganismo e em determinadas condições desfavoráveis aos animais, possibilitariam então, o desencadeamento do quadro clínico.

SLEE et alii (1988), na Australia, sugeriram tendo em vista o isolamento frequente do sorogrupo O III de *Yersinia pseudotuberculosis* em ruminantes por diversos outros autores (HODGES et alii, 1984; HODGES & CARMAN, 1985), e raramente isolado em outras espécies animais (pássaros, roedores e outros animais), de que os próprios bovinos sejam o reservatório deste microrganismo. Segundo estes autores, isto seria válido também para a região de Gippsland, onde aconteceram os surtos de diarréia bovina pelo citado microrganismo. Nesta região, numa propriedade com 51 bezerros com idades variando de 12 a 16 semanas, os autores verificaram que 32 destes estavam excretando *Yersinia pseudotuberculosis* do sorogrupo O III em suas fezes, o que reforça a hipótese dos autores de que seriam realmente os bovinos os reservatórios do microrganismo, e que haveria manifestação clínica da doença, quando condições estressantes e de meio ambiente estivessem atuando conjuntamente.

Segundo os autores, a excreção de *Yersinia pseudotuberculosis* nas fezes ocasionaria uma contaminação pesada, do meio ambiente, expandindo rapidamente então a infecção para os outros animais susceptíveis.

Ainda quanto a possibilidade dos próprios bovinos serem os responsáveis pela disseminação do microrganismo entre eles mesmos, na Nova Zelândia, HODGES & CARMAN (1985), usando meios seletivos, isolaram *Yersinia pseudotuberculosis* a partir de fezes de bovinos aparentemente sadios, em 26,3 % das 509 amostras examinadas. Porém, no mesmo país, BULLIANS (1987), usando técnicas bacteriológicas similares, conseguiu o isolamento de apenas uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* dentre 330 amostras de fezes examinadas. Outros autores, pesquisaram o microrganismo em amostras bovinas sem sucesso (ZEN-YOJI et alii, 1974; FUROWICZ et alii. 1975; FUROWICZ et alii, 1977; WALLS & LEVETT, 1988).

Quanto aos possíveis reservatórios de *Yersinia pseudotuberculosis* na natureza, BERCOVIER & MOLLARET (1984), afirmam por fim, que os animais também podem se infectar a partir de reservatórios telúricos. Na Europa, o isolamento do sorogrupo O II do solo e do sorogrupo O I do solo e águas da Sibéria, reforçam a importância que podem ter, no desencadeamento desta zoonose.

MOLLARET (1963), realizando um experimento de viabilidade do microrganismo no solo não esterilizado, demonstrou que a *Yersinia pseudotuberculosis* pode sobreviver por 11 meses. Este tempo seria suficiente para preservar o microrganismo nos campos através do ano, possibilitando que este se multiplique, principalmente nos meses mais frios, conforme mencionado por BERCOVIER & MOLLARET (1984) e infec-

te os bovinos, quando condições estressantes como as que normalmente ocorrem nos meses invernais atingem os animais, desencadeando por fim o quadro clínico.

Na Australia, CALLINAN et alii (1988), mencionaram que na ocasião em que ocorreram os casos de diarréia bovina, os campos estavam pouco drenados e alagadiços, devido as fortes chuvas. As pastagens mesmo após o cessar das chuvas, permaneceram "sujas" de lama seca. Segundo estes autores, a habilidade deste microrganismo de se multiplicar na água a baixas temperaturas deve ter tido um papel importante no desencadeamento desta doença nos bovinos.

Ainda a respeito de portadores assintomáticos, HENDERSON & HEMMINGSEN (1983), com objetivo de esclarecer a origem dos surtos de Yersiniose pseudotuberculosa em fazendas criatórias de cervos na Nova Zelândia onde se constitui na doença de maior importância, realizaram pesquisa deste microrganismo em 3810 amostras de fezes de cervos aparentemente sadios, pertencentes a 122 fazendas de criação deste rumiante silvestre. Foram isoladas 5 (0,13%) cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*. Os autores acreditam que o baixo número de cepas isoladas deva-se à inexistência do fenômeno de portadores nesta espécie animal e que os surtos que ocorrem frequentemente, provavelmente tenham outra fonte de contaminação. Porém, os autores fazem uma ressalva, na qual, segundo elas, os microrganismos poderiam estar sendo eliminados só ocasionalmente, e que não seriam por isto detectados na técnica usada, levando a uma falsa interpretação.

Posteriormente ao trabalho de HENDERSON & HEMMINGSEN (1983), também na Nova Zelândia, HODGES & CARMAN (1984), realizaram um trabalho semelhante em 10 fazendas de criações de cervos, aparentemente sadios, encontrando fazendas que ti-

nham 42% de animais portadores e outras 0%. Na média 10,7% dos cervos examinados portavam em suas fezes *Yersinia pseudotuberculosis*. Os autores não concordam com as opiniões expressas pelos autores anteriormente citados. Por fim, citam que semelhantes achados bacteriológicos são também frequentes em bovinos.

Por fim, levando em conta todas estas considerações a respeito, vale mencionar a opinião dada por ACHA & SZYFRES (1986) a respeito do assunto: "Na epidemiologia da Yersiniose pseudotuberculosa, ainda existem muitos aspectos a elucidar".

5.7. ISOLAMENTO DE *Yersinia pseudotuberculosis* EM CULTURAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS

A técnica do crioenriquecimento a 4°C possibilitou o isolamento de 16 (26,66%) cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* que não tinham sido isoladas no cultivo primário. Já o cultivo primário, ou seja, o cultivo direto sem o crioenriquecimento prévio, possibilitou o isolamento de 44 (73,33%) cepas (Figura 9). Estes resultados comprovam a eficiência de sua utilização no isolamento deste microrganismo, naqueles casos em que os resultados iniciais forem negativos.

Alguns autores possuem opiniões favoráveis em relação a sua utilização. Para estes, o seu uso possibilitaria a multiplicação do microrganismo em questão, que poderia estar em pequeno número na ocasião do exame e que mediante técnicas rotineiras, não seria possível isolar (PATERSON &

COOK, 1963; EISS, 1975). Outros acreditam que o seu uso, possibilitaria a multiplicação de microrganismo pertencentes a este gênero ou de biotipos de algumas espécies de *Yersinia* sp, não implicados diretamente com o caso clínico, e que poderiam levar a uma falsa interpretação do envolvimento deste microrganismo no caso clínico (VAN NOYEN et alii, 1980). Estes autores, após anos de experiência em bacteriologia, acreditam que não haja necessidade do seu uso no isolamento de membros do gênero *Yersinia* quando se tratam de casos clínicos. Para eles, se este microrganismo for o responsável pelo quadro entérico, seguramente estará em número suficientemente grande, para ser isolado nos meios de cultura normalmente utilizados na rotina bacteriológica para enterobactérias em geral e que o tempo requerido com a técnica do crioenriquecimento seria "demasiadamente longo e extravagante para o clínico e entedioso para o bacteriologista".

FUKUSHIMA et alii (1983), num experimento com 618 amostras de fezes de bovinos aparentemente saudáveis, isolou mediante a técnica do crioenriquecimento, 7 cepas de *Yersinia enterocolitica* e 7 cepas de *Yersinia kristensenii*, todas consideradas como cepas do "meio ambiente", ou seja, cepas não envolvidas com algum tipo de patologia animal. Os autores, baseados neste experimento e de outros pesquisadores, acreditam que os bovinos não devem ser considerados "reservatórios" de cepas potencialmente patogênicas. Porém neste mesmo trabalho, os autores isolaram uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* do sorogrupo O II B, cepa esta que não pode ser considerada do "meio ambiente", já que este sorogrupo é o segundo mais frequentemente isolado na Grã-Bretanha, envolvido em patologia animal, segundo dados de MAIR et alii(1979).

As opiniões de FUKUSHIMA et alii (1983), parecem ir ao encontro das já citadas por VAN NOYEN (1980), de que o crio-enriquecimento possibilita o isolamento de cepas consideradas do "meio ambiente", não envolvidas em casos clínicos. Por outro lado, esta técnica também possibilita o isolamento de cepas potencialmente patogênicas, conforme demonstrado pelos próprios resultados de FUKUSHIMA et alii (1980).

Segundo OBERHOFER & PODGORE (1980), o isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* a partir de hemoculturas é relativamente fácil, devido a pouca contaminação de outros microrganismos. Porém, o mesmo torna-se extremamente dificultado, quando se trata de material fecal. Segundo estes autores, devido a estas dificuldades é que foram surgindo diversas metodologias de isolamento, tentando facilitar a recuperação deste microrganismos, porém nenhuma até a presente data, mostrou-se como "padrão ideal". Para os citados autores a escolha do tempo de incubação bem como da temperatura para o crioenriquecimento são fatores de maior importância que a escolha do meio de cultura.

HENDERSON & HEMMINGSEN (1983), com objetivo de realizar um levantamento dos cervos portadores assintomáticos, pesquisou *Yersinia pseudotuberculosis* em 3810 amostras fecais. Os autores utilizaram a técnica do crioenriquecimento a 4°C por 7 dias. Neste estudo foram isoladas 5 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* que pertenciam a um mesmo grupo, ou seja O III. Conforme já visto, o sorogrupo O I é o mais frequentemente isolado de casos clínicos humanos e animais (MAIR et alii, 1979; ACHA & SZYFRES, 1982). Porém o sorogrupo O III, na Grã-Bretanha, é o terceiro mais frequentemente isolado (MAIR et alii, 1979). Além disto, este sorogrupo, tendo em vista a literatura consultada, não é

considerado como pertencente ao grupo das cepas do "meio" ambiente". No que se refere a problemas clínicos entéricos em bovinos, búfalos e veados, parece ser o mais frequentemente isolado (OLIVEIRA et alii, 1983; SUZUMURA et alii, 1984; WARTH et alii, 1984); CALLINAN et alii, 1988).

No presente experimento realizado não foram isoladas cepas de outras espécies do gênero no cultivo primário, nem nos cultivos submetidos ao crioenriquecimento. Conforme mostra a Figura 22, as fezes positivas para *Yersinia pseudotuberculosis*, quando semeadas na placa de MacConkey, mostraram um predomínio de mais de 90% de colônias do microrganismo sobre os outros. De uma maneira geral isto ocorreu em todas as culturas positivas no cultivo primário, e estes resultados parecem confirmar as opiniões de VAN NOYEN et alii (1980).

Por outro lado, verificou-se neste estudo que o crioenriquecimento demonstrou ser de grande valia, naqueles casos em que estes bovinos acometidos de diarréia tinham sido previamente medicados pelos proprietários dos animais, antes de efetuadas as coletas. Neste casos, em que o número de microrganismos viáveis pode estar crítico para serem isolados num cultivo primário, o seu uso mostrou-se de grande valia. Isto pode ser observado nas Tabelas 12 e 13. Em alguns casos, verifica-se que foi preciso tempo superior a 7 dias e até mesmo a 14 dias, para realizar o isolamento. Também observa-se nas mesmas tabelas que as culturas positivas com 7 dias também o foram no 14º e 21º dia. Constatou-se na verdade, apenas uma diferença entre o resultado destas mesmas culturas. Houve um maior número de colônias do microrganismo com o passar do tempo e um declínio dos outros microrganismos presentes.

O uso indiscriminado de antibióticos seguramente deve ter influido no número de cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* isoladas. Provavelmente, se muitos destes animais não tivessem sido tratados previamente pelos proprietários, o número destes isolamentos seria bem superior ao que foi, já que todas as cepas mostraram boa sensibilidade a quase todos os antibióticos. Com isto, provavelmente teríamos uma visão mais clara da importância deste microrganismo nos casos de diarréia bovina no Estado do Paraná, nos meses de outono e inverno.

5.8. MORBIDADES E MORTALIDADES BOVINAS ATRIBUÍDAS POSSIVELMENTE A *Yersiniose pseudotuberculosa* NO ESTADO DO PARANÁ

Observou-se no ano de 1987 as taxas de morbidade e mortalidade bovina, possivelmente atribuídas a infecção entérica pela *Yersinia pseudotuberculosis* em 12 diferentes fazendas de criação de gado. Na faixa etária dos bezerros não foram observados casos de diarréia. Na faixa etária dos animais considerados novilhos, a taxa média de morbidade situou-se em 10,3% com taxas de mortalidade de 1,0%. Na faixa etária dos animais considerados adultos, a morbidade média foi de 6,7% e a da mortalidade situou-se em 2,6% (Tabela 14). No ano seguinte (1988), abrangendo 19 fazendas, a faixa etária dos bezerros novamente não foi atingida, enquanto que na faixa etária dos novilhos, a taxa média da morbidade situou-se em 13,4% e da mortalidade em 2,7%. Já na faixa etária dos adultos, a taxa média de morbidade foi de 11,7% e a da mortalidade 2,6% (Tab. 15). Dados interessantes podem ser tirados destes resultados. O primeiro deles é talvez o mais curioso:

so, refere-se ao sucedido na faixa etária dos bezerros. Em dois anos de observações abrangendo 31 propriedades diferentes, que tiveram animais com diarréia positivas para *Yersinia pseudotuberculosis*, não se constatou a nível de campo, animais desta faixa etária apresentando esta síndrome, embora convivessem juntos com outros animais de outras faixas etárias atingidas. Esse dado vem a confirmar o que foi dito na introdução deste trabalho, de que "desde 1982, verifica-se surtos de diarréia bovina... atingindo animais com idades superiores a 1 ano, de raças indianas, em criações extensivas de gado de corte". Interessante também mencionar, de que é justamente na faixa etária dos bezerros, que ocorrem as diarréias bacterianas neonatais por *E. coli* (GAY, 1965; SOJKA, 1966; ACRES, 1985) e pelas *Salmonella dublin* e *Salmonella typhimurium* (GIBSON, 1961; EDWARDS & GALTON, 1967) bem como pelas viroses entéricas (ACRES, 1985).

Outra constatação é a de que todas as 31 fazendas atingidas criavam apenas gado de corte, de raça Nelore, e não gado leiteiro. Também constatá-se nas Tabelas 14 e 15 nos dois anos estudados, de que os novilhos tiveram taxas médias de morbidade mais altas (10,3% e 13,4%) do que os adultos (6,7% e 11,7%). Porém, no ano de 1987, as taxas de mortalidade dos novilhos (1,0%) foi menor do que a encontrada nos animais adultos (2,6%) e no ano seguinte, praticamente estas taxas de mortalidade se equivaleram (novilhos 2,7% e adultos 2,6%). Analisando individualmente fazenda por fazenda, observa-se que as taxas de morbidade nos dois anos estudados foram muito variáveis, atingindo muitas vezes, médias cima ou próximos de 50%, outras vezes, médias abaixo de 5%. Já as taxas de mortalidade situaram-se em níveis

abaixo de 5% em sua grande maioria.

Quanto as taxas de morbidade e mortalidade observadas por outros pesquisadores, nos casos de Yersiniose pseudotuberculosa bovina e bubalina, encontram-se poucas informações:

BEHRA et alii (1984), na Índia, não mencionaram as taxas de morbidade e mortalidade ocorridas na ocasião. Apenas citaram que seis bezerros bubalinos com idades variando de 6 a 9 meses foram atingidos.

CALLINAN et alii (1988), mencionaram que durante os três anos de observações abrangendo 17 fazendas, de uma maneira geral os animais afetados eram adultos e nenhum com idade inferior a 6 meses. As taxas de morbidade situaram-se em 8% e as de letalidade em 58%.

Na Australia, SLEE et alii (1988), observaram os seguintes dados em relação as idades dos animais afetados: 30,9% eram bezerros, com idades de até um ano, 27,7% eram animais de 1 ano ou um pouco mais; 19,0% eram novilhas ou novilhos (acima de 2 anos) e 27,7% eram bovinos adultos com idades acima de 36 meses. Em relação às fezes recebidas dos animais que apresentavam diarréia, os autores verificaram que, 32,6% delas eram de bezerros; 7,8% de animais com idades de um ano ou um pouco mais; 7,0% eram de novilhas e 52,7% eram de animais adultos com idade acima de 1 ano. Segundo os autores, embora muitas amostras de fezes pertencessem a bezerros com idades abaixo de 3 semanas, nenhuma delas foi positiva para *Yersinia pseudotuberculosis*. Para os mesmos autores este tipo de infecção entérica ocorre mais frequentemente entre os animais adultos e novilhos e que segundo eles vai ao encontro dos resultados encontrados por CALLINAN et alii (1988), os quais não encontraram animais com

idades abaixo de 6 meses com problemas de Yersiniose pseudotuberculosa. Para os autores o não isolamento do microrganismo em animais com idades abaixo de 3 semanas indicaria que os anticorpos colostrais protegeriam o bezerro nesta idade.

Quanto as taxas de morbidade e mortalidade verificadas em outros surtos de Yersiniose pseudotuberculosa ocorridos no Brasil verificou-se os seguintes dados:

OLIVEIRA et alii (1983), no Estado do Paraná, não mencionam no trabalho as taxas de morbidade e mortalidade ocorridas nos búfalos afetados pela síndrome diarréica. Segundo dados da Secretaria da Agricultura, o rebanho era composto de 120 animais, com idades variando de 8 a 14 meses, dos quais 70 (58,3%) foram atingidos pelo problema e 35 (15,9%) morreram.

WARTH et alii (1984), no Estado do Paraná, mencionam a ocorrência de 7 surtos de diarréia bovina positivos para *Yersinia pseudotuberculosis*, ocorridos nos anos de 1983 e 1984. Não são citadas no trabalho as prováveis taxas de morbidade e mortalidade de cada caso, porém, segundo dados da Secretaria da Agricultura, a população total de bezerros das sete fazendas era de 686 animais dos quais 6 adoeceram (0,8%) e 6 morreram (0,8%). A população total de novilhos era de 714 animais, sendo que 69 (9,6%) adoeceram e 21 (2,9%) morreram. A população dos animais adultos era de 1530 animais, sendo que 160 (10,4%) adoeceram e 136 (8,8%) vieram a óbito.

Também no Estado do Paraná, SUZUMURA (1984), constatou em uma fazenda do município de Loanda problemas diarréicos em 170 animais, dos quais 61 vieram a óbito, apresen-

tando taxas de letalidade de 36,8%. Embora não mencione as taxas de morbidade e mortalidade das três faixas etárias envolvidas, dados da Secretaria da Agricultura mostram que os bovinos desta propriedade na faixa etária compreendida entre os bezerros (36 animais), tanto as taxas de morbidade quanto de mortalidade, foram de 11,1%. A faixa etária dos novilhos (258 animais), não foi afetada. Já a faixa etária que compreendia animais adultos, (316 animais), foi a mais atingida, apresentando morbidade e mortalidade de 52,53% e 18,03% respectivamente.

Ainda no Estado do Paraná, SARIDAKIS et alii (1988), não apresentaram as taxas de morbidade e mortalidade, já que o trabalho tratava-se de análise bacteriológica de fezes de bezerros somente, porém citam que estes 3 animais positivos tinham idade variando de 9 dias a 12 meses. Segundo dados da Secretaria da Agricultura fornecidos pelo médico veterinário da unidade de Assaí, a população de bezerros dessa propriedade positiva para *Yersinia pseudotuberculosis* era de 78 animais, sendo que 8 foram afetados e 7 morreram, apresentando portanto, taxas de morbidade e mortalidade de 10,2% e 8,9% respectivamente. Já na faixa etária dos novilhos a população era de 127 animais, dos quais apenas 2 foram afetados e vieram a óbito, com taxas de 1,5% tanto para a morbida de quanto da mortalidade. Na faixa etária dos adultos, de 107 animais, 15 foram afetados e 13 vieram a óbito, com taxa de morbidade e mortalidade de 14,0% e 12,1% respectivamente. Vale mencionar também de que nesta fazenda, também isolamos *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III, no ano de 1984 concomitantemente com SARIDAKIS et alii (1988).

RIET-CORRÊA et alii (1990), no Rio Grande do Sul, tendo como base três surtos de Yersiniose pseudotubercu-

losa em bubalinos encontraram taxas médias de mortalidade de 8,2% nos animais considerados adultos e 22,1% para os animais considerados bezerros.

Verifica-se portanto, que muitas destas taxas foram muito superiores as médias encontradas nestes dois anos de trabalho. Porém ao analisarmos individualmente as taxas encontradas em cada fazenda, encontram-se algumas elevadas como as ocorridas nas fazendas nºs 3, 7 e 14 que foram de 69,5%, 62,5% e 70,0% para a morbidade, e 6,0%, 15,0% e 15,0% para a mortalidade entre os animais adultos (Tabela 15).

Como já foi mencionado, diversos fatores influenciaram a dimensão da morbidade e mortalidade. Destacaram-se entre estes, o completo desconhecimento do problema infeccioso por parte do criador. Para este, tratava-se de um "curso da brota verde do pasto", que normalmente ocorre no final do inverno e início da primavera. No caso específico ocorrido em Loanda, segundo dados da Secretaria da Agricultura, o médico veterinário só foi chamado após 10 dias de iniciado o problema, quando já haviam morrido 20 vacas e um bezerro. O resultado laboratorial foi dado após 48 horas, o que possivelmente com certeza, uma maior expansão do problema no rebanho. Quando os animais foram tratados com cloranfenicol ou com tetraciclina, a diarréia cessou porém, muitos morreram pela acentuada desidratação e fraqueza que apresentavam. Caso tivessem sido tratados logo no início do problema, certamente as taxas de morbidade e mortalidade seriam bem menores.

6. CONCLUSÕES

A Yersiniose pseudotuberculosa bovina apesar de rara ocorre em diversos países do mundo assim como no Brasil.

Yersinia pseudotuberculosis é um enteropatógeno frequentemente isolado das fezes e dos conteúdos intestinais de bovinos com sintomatologia diarréica no Estado do Paraná, tendo sido isolado de 18,0% das amostras bovinas examinadas.

Yersinia pseudotuberculosis estava presente em 21% das amostras de fezes diarréicas bovinas examinadas.

Yersinia pseudotuberculosis estava presente em 15% dos conteúdos de intestino delgado bovino examinados.

Yersinia pseudotuberculosis estava presente em 9% dos conteúdos de intestino grosso bovino examinados.

O sorogrupo O III de *Yersinia pseudotuberculosis* foi o único implicado nos casos de diarréia bovina no Estado do Paraná nos anos de 1987 e 1988.

As 60 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* mostraram identica sensibilidade frente aos antimicrobianos utilizados.

A cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* do sorogrupo O III, mostrou-se patogênica para os cobaios, (*Cavia porcellus*) quando administrada per os.

As cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* sorogrupo O III apresentaram reação bioquímica atípica em relação a melibiose.

A temperatura de incubação parece ter influenciado na patogenicidade da cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* quando administrada per os a cobaios (*Cavia porcellus*).

A Yersiniose pseudotuberculosa bovina no Estado do Paraná caracteriza-se por ser uma enfermidade de ocorrência sazonal, incidindo nos meses mais frios do ano associada a quadros entéricos.

Os reservatórios de *Yersinia pseudotuberculosis* no Estado do Paraná são incertos.

O uso do crioenriquecimento a 4°C possibilitou o isolamento de 26,6% das cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* sendo considerado um excelente método de diagnóstico para esta espécie bacteriana.

Os bovinos com idades superiores a um ano apresentaram maior susceptibilidade a doença do que os bezerros.

7. SUMMARY

The main purposes of this research was to search for *Yersinia pseudotuberculosis* in faecal samples from bovine with diarrhoea, from farms in the State of Paraná. We have analyzed 220 faecal samples, 60 samples from small intestine contents and 56 samples from large intestine contents. *Yersinia pseudotuberculosis* isolation was positive in 46(21%), 9(15%) and 5(9%), respectively, totalizing 60 strains of the microrganism.

The 60 strains of *Yersinia pseudotuberculosis* belong to serogroup O III, and they shown identical sensibility to antibiotics and other drugs, when tested in vitro.

Through the statistical methods, χ^2 test, we found a positive correlation between *Yersinia pseudotuberculosis* isolation and the winter season. To establish the morbidity and mortality rates, cattle population was separated into three age related categories, which are: calves, yearlings and adults. In 1987 and 1988, the morbidity rates were 0%, 10,3% and 6,7%; 0%, 13,4% and 11,7%, respectively. In relation to mortality rates, they were 0%, 1,0% and 2,6% in 1987, and 0%, 2,1% and 2,6% in 1988.

The strains of *Yersinia pseudotuberculosis* placed on serogroup O III, were pathogenic to guinea pigs, when given per-os.

We didn't get any isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from wild rodents and others, but we still think that they may be incriminated in the transmission of the microorganism to bovines, although the bovines as well as the soil, may function as reservoirs of the bacteria.

Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* in primary cultures was possible in 73,33%, although 26,66% of the isolations were successfull only after cold-temperature enrichment, with incubation at 4 C for 7, 14 and 21 days.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Yersiniosis. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publ. Cient. Org. Panam. Salud (354):122-7, 1977.
2. ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Yersiniosis seudotuberculosa. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2.ed. Publ. Cient. Org. Panam. Salud. p. 196-200, 1986.
3. ACRES, S.D. Enterotoxigenic Escherichia coli Infections in Newborn Calves: A Review. J. Dairy Sci. 68:229-56, 1985.
4. AHVONEN, P.; THAL, E.; VASENIUS, H. Occurrence of Yersinia enterocolitica in Finland and Sweden. Contr. Microbiol. Immunol., 2:135-6, 1973,
5. ALLARD, A.W. Yersinia pseudotuberculosis in a Cat. J. Am. Vet. Med. Assoc., 174:91-2, 1979.
6. ALUISIO, C.G.G.; MEHLMAN, I.J.; SANDERS, A.C. Alkali Method for Rapid Recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from Foods. Appl. Environ. Microbiol., 39:135-40, 1980.
7. ARNALL, L. & KEYMER, I.F. Pseudotuberculosis (Yersinia pseudotuberculosis or Pasteurella pseudotuberculosis infection. In: Bird diseases. London, Baillière R.

* De acordo com :

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NB66: Referências Bibliográficas. In: --- Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. v.1, p. 13-30. SERIAL sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1988.

- Tindall, T.F.H. Publ. 1975. p. 125-28
8. BALTAZARD, M. Situação atual do trabalhador de pesquisa sobre a peste no Brasil. Rev. Bras. Malar. e Doenças Trop., 20:368-390, 1968.
 9. BARCELLOS, D.E.S.N. & CASTRO, A.F.P. Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from diarrhoea in pigs. Br. Vet. J., 137:95-6, 1981.
 10. BARCELLOS, D.E.S.N.; GUIZZARDI, I.I.; FALLAVENA, L.C.B. Frequência e causa de diarréias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e Missões. Bol. Inst. Pesq. Vet. Desiderio Finamor, 7:27-37, 1980.
 11. BATRA, H.V. Occurrence of Yersinia. Serratia and Pseudomonas associated gastrointestinal disturbances in cattle and man along with the detection of rats and pigs as their natural reservoir. Hissav. 1979. (Tese de Mestrado - Haryana Agricultural University - India).
 12. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing a standardizes single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-6, 1966.
 13. BEHRA, G.D.; GARG, D.N.; BATRA, H.V.; CHANDIRAMANI, N.K. Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from bovine (buffalo) calves with enteric disorders. Microbiol. Immunol., 28:237-41, 1984.
 14. BERCOVIER, H. & MOLLARET, H.H. Genus XIV Yersinia Van Loghem. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt, 9.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. p. 498-506.
 15. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Ed. N.R. Krieg, J.G. Holt. 9.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. 964 p.
 16. BIER, O. Técnicas Bacteriológicas. In: Bacteriologia e Imunologia. 19.ed. São Paulo. Melhoramentos, 1978. p. 784.
 17. BLACKALL, P. Survey of prevalence of Yersinia species in swine. Aust. Vet. J., 53:407, 1977.
 18. BOLIN, I. & WOLF-WATZ, H. Molecular Cloning of the

- Temperature - Inducible Outer membrane Protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. Infect. Immun., 43: 72-8, 1984.
19. BOLIN, I.; NORLANDER, L.; WOLF-WATZ, H. Temperature-Inducible Outer Membrane Protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica Is Associated with the Virulence Plasmid. Infect. Immun., 37: 506-12, 1982.
 20. BORST, G.H.A.; BUITELAAR, M.; POELMA, F.G.; ZWART, P. ; DORRESTEIN, G.M. Yersinia pseudotuberculosis in Birds. Tijdschr. Diergeneeskde., 102:81-5, 1977.
 21. BREWER, R.A. & CORBEL, M.J. Characterization of Yersinia enterocolitica strains isolated from cattle, sheep and pigs in the United Kingdom. J. Hyg., (Camb.) 90: 425-33, 1983.
 22. BUHLES, W.C.; VANDERLIP, J.E.; RUSSELL, S.W.; ALEXANDER, N.L. Yersinia pseudotuberculosis Infection: Study of an Epizootic in Squirrel Monkeys. J. Clin. Microbiol., 13:519-25, 1981.
 23. BULLIANS, J.A. Yersinia species infection of lambs and cull cows at an abattoir. N.Z. Vet. J., 35:65-7, 1987.
 24. CABASSI, E.; ALLODI, C.; BRINDANI, F. Sulla presenza di Yersinia enterocolitica e Yersinia pseudotuberculosis nelle feci e nei linfonodi ciecali di bovini. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 29:632-6, 1976.
 25. CALLINAN, R.B.; COOK, R.W.; BOULTON, J.G.; FRASER, G.C.; UNGER, D.B. Enterocolitis in cattle associated with Yersinia pseudotuberculosis infection. Aust. Vet., 65: 8-11, 1988.
 26. CAPPUCCI, D.T.J.; DANIELS, R.B.; PERELLI-MINETTI, J.E.; FURLONG, H.J.; WILCOX, M.A. Caprine mastitis associated with Yersinia pseudotuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 173:1589-90, 1978.
 27. CARTER, P.B. Pathogenicity of Yersinia enterocolitica for mice. Infect. Immun., 11:164-70, 1975.

28. CARTER, P.B. & COLLINS, F.M. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: Kinetics of growth. Infect. Immun., 9:851-7, 1974.
29. CARTER, P.B.; ZAHORCHAK, R.J.; BRUBAKER, R.R. Plague Virulence Antigens from *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 28:638-40, 1980.
30. CHANG, M.T.; SCHINK, J.; SHIMAOKA, J.; DOYLE, M.P. Comparison of Three Tests for Virulent *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 20:589-91, 1984.
31. DAVEY, G.M.; BRUCE, J.; DRYSDALE, E.M. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from faeces of cows. J. Appl. Bacteriol., 55:439-43, 1983.
32. DEE, V.W. *Yersinia pseudotuberculosis* - Aborterreger beim Rind. Monatsh. Vet. Med., 40:721-2, 1985.
33. DIFCO Manual. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. 10.ed. Detroit, Difco Laboratories, 1984.
34. DOYLE, M.P.; HUGDAHL, M.B.; CHANG, M.T.; BEERY, J.T. Serological Relatedness of Mouse-Virulent *Yersinia enterocolitica* - Infect. Immun., 37:1234-40, 1982.
35. EDWARDS, P.R. & GALTON, M.M. Salmonellosis. Adv. Vet. Sci., 11:1-63, 1967.
36. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publ., 1972. 362 p.
37. ECHEQUE, L. & SOSA DE CARUSO, N. Seudotuberculosis a *Pasteurella seudotuberculosis*. Ann. Fac. Vet. (Uruguay), 8:55-67, 1959.
38. EISS, J. Selective Culturing of *Yersinia enterocolitica* at Low temperature. Scand. J. Infect. Dis., 7: 249-51, 1975.
39. ESSEVELD, H. & GOUDZWAARD, C. On the Epidemiology of *Y. enterocolitica* Infections: Pigs as the Source of Infections in Man. Contr. Microbiol. Immunol., 2: 99-101, 1973.
40. FALCÃO, D.P. Estudos sobre as espécies *Yersinia ente-*

- rocolitica e Yersinia pseudotuberculosis. Araraquara, 1976. 147 p. (Tese de Livre Docencia - Fac. Farmacia e Odontologia, Univ. Est. Paulista).
41. FALCÃO, D.P. Présence de Yersinia enterocolitica et Yersinia pseudotuberculosis en Amérique Latine. Rev. Microbiol. (São Paulo), 12:5-10, 1981.
 42. FALCÃO, D.P. Yersiniosis in Brazil. Contr. Microbiol. Immunol., 9:68-75, 1987.
 43. FALCÃO, D.P.; EWING, W.H.; DOWELL, V.R. Cultural Characteristics of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis on Differential Media. Contr. Microbiol. Immunol. 5:88-94, 1979.
 44. FEINHAKEN, D.; SECHTER, I.; PRESS, L.; ELAD, D. Yersinia enterocolitica in pigs and cattle. Israel. 1982/3. Israel J. Med. Sci., 20:475, 1984.
 45. FERBER, D.M. & BRUBAKER, R.R. Plasmids in Yersinia pestis. Infect. Immun., 31(2):839-41, 1981.
 46. FERREIRA, A.J.P.; PELAYO, J.S.; SARIDAKIS, H.O.; FALCÃO, D.P. Isolamento de Yersinia sp. em animais na região de Londrina-Pr. In: Simpósio. estagiários. 4º. Londrina, 1985. Abstracts. Londrina, 1985. p. 55.
 47. FUKUSHIMA, H.; SAITO, K.; TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; KAWAKA, Y. Isolation of Yersinia spp. from Bovine Feces. J. Clin. Microbiol., 18:981-2, 1983.
 48. FUROWICZ, A.J.; ZAMORA, A.; TERZOLO, H. Primeros estudios e investigaciones de la actuacion de las bacterias Yersinia rodentium (Pseudotuberculosis) y Yersinia enterocolitica en los animales. Gac. Vet. (B. Aires), 37:307-14, 1975.
 49. FUROWICZ, A.J.; PEREIRA, J.J.; TERZOLO, H.R. Investigaciones sobre la incidencia de las bacterias Yersinia Rodentium (Bacile de Malassez y Vignal) e Yersinia enterocolitica (Pasteurella "X") en los animales. Rev. Med. Vet. (B. Aires), 58:325-35, 1977.
 50. FUROWICZ, A.J.; BAGNAT, E.; TERZOLO, H.R.; GRENOVIVH, H.; PESACO, A.; PEREIRA, J.J.; ZAMORA, A.S.; ZORATI DE VERONA, A. Primer aislamiento en la Argentina de Yer-

- sinia pseudotuberculosis (bacilo de Malassez Y Vignal) de un cobayo (Cavia porcellus) y de materia fecal humana. Medicina (B. Aires)., 38:45-52, 1978.
51. GELEV, I. Bacterial Infection in Cows Associated with Abortion Endometritis and Infertility. Zentralbl. Veterinaermed., 22:372-80, 1975.
52. GEMSKI, P.; LAZERE, J.R.; CASEY, Y. Plasmid Associated with pathogenicity and Calcium dependency of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun., 27:682-85, 1980a.
53. GEMSKI, P.; LAZERE, J.R.; CASEY, T.; WOHLHIEDER, J.A. Presence of a Virulence-Associated Plasmid in Yersinia pseudotuberculosis. Infect. Immun., 28: 1044-47, 1980b.
54. GIBSON, E.A. Salmonellosis in Calves. Vet. Rec., 73: 1184-95, 1961.
55. GINI, A.G. & TORRES, M.F. Primeiros aislamientos de Yersinia enterocolitica en Centro América y revision de la literatura. Rev. Lat. Am. Microbiol., 21:107-113, 1979.
56. GOYON, M. Endocardite végétante à Yersinia enterocolitica chez un bovin. Rec. Med. Vét. CXLV, 1969.
57. GRABER, H. & KNAPP, W. Die abscedierende reticulocitäre Lymphadenitis mesenterialis (Masshoff) als Bestandteil eines enteralen Primarkomplexes und Folge einer Infektion mit Pasteurella pseudotuberculosis. Frank. Z. Pathol., 66:399-415, 1955.
58. HARCOURT-BROWN, N.H. Yersinia pseudotuberculosis infection in birds. Vet. Rec., 102:315, 1978.
59. HAWARI, A.D.; AMTSBERG, G.; KIRPAL, G. Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr., 94:404-9, 1981.
60. HEESEMANN, J.; ALGERMISSEN, B.; LAUFS, R. Genetically Manipulated. Virulence of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun., 46:105-10, 1984.
61. HENDERSON, T.G. Yersiniosis in deer from the Otago Southland region of New Zealand. N.Z. Vet. J., 31:221-4, 1983.

62. HENDERSON, T.G. & HEMMINGSEN, P. Faecal survey of deer for Yersinia pseudotuberculosis and Salmonella sp. N.Z. Vet. J., 31:225-6, 1983.
63. HODGES, R.T. & CARMAN, M.G. Yersinia pseudotuberculosis recovered from the faeces of clinically healthy deer. N.Z. Vet. J., 32:79, 1984.
64. HODGES, R.T.; CARMAN, M.G.; MORTIMER, W.J. Serotypes of Yersinia pseudotuberculosis recovered from domestic livestock. N.Z. Vet. J., 32:11-3, 1984.
65. HODGES, R.T. & CARMAN, M.G. Recovery of Yersinia pseudotuberculosis from the faeces of healthy cattle. N.Z. Vet. J., 33:175-6, 1985.
66. HOFER, E.; FERNANDES, M.F.T.; VEIGA, T.; OLIVEIRA, M.S.; ABRHAM, A.T. Isolamento de Yersinia pseudotuberculosis e Yersinia enterocolitica de roedores capturados no município de Friburgo, R.J. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10:.. Rio de Janeiro, 1979. Programa. Resumos. Rio de Janeiro, 1979. p.62.
67. HUBBERT, W.T. Yersiniosis in Mammals and Birds in the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21:458-62, 1972.
68. HUGHES, D. Isolation of Yersinia enterocolitica from milk and a Dairy Farm in Australia. J. Appl. Bacteriol., 46:125-30, 1979.
69. INOUE, M. & KUROSE, M. Isolation of Yersinia enterocolitica from Cow's Intestinal Contents and Beef Meat. Jpn. J. Vet. Sci., 37:91-3, 1975.
70. INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR. Manual para coleta e remessa de material, para exame de laboratório. Guaiba-RS, 1981 [Apostila].
71. JACKSON, S. & BURROWS, T.W. The Virulence - Enhancing Effect of Iron on Non-pigmented Mutants of Virulent Strains of Pasteurella pestis. J. Exp. Pathol., 37: 547-83, 1956.
72. JAMIESON, S. & SOLTYS, M.A. Infectious Epididymo-orchitis of Rams Associated with Pasteurella pseudotuberculosis. Vet. Rec., 59:351-3, 1947.

73. JERRET, I.V. & SLEE, K.J. Bovine abortion associated Yersinia pseudotuberculosis infection. Vet. Pathol., 26:181-3, 1989.
74. JONES, T.O. Caprine mastitis associated with Yersinia pseudotuberculosis Infection. Vet. Rec., 110:231, 1982.
75. KAPPERUD, G. Yersinia enterocolitica and Yersinia like microbes isolated from mammals and water in Norway and Denmark. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 85:129-135, 1977.
76. KAPPERUD, G. Studies on The Pathogenicity of Yersinia enterocolitica and Y. enterocolitica-like Bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 88: 287 - 91, 1980.
77. KAPPERUD, G. & LASSEN, J. Relationship of Virulence - Associated Autoagglutination to Hemagglutinin Production in Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-Like Bacteria. Infect. Immun., 42:163-69, 1983.
78. KAPPERUD, G.; NAMORK, E.; SKARPEID, H.J. Temperature - Inducible Surface Associated with the Virulence Plasmid of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. Infect. Immun., 47:561-66, 1985.
79. KARBE, E. & ERICKSON, E.D. Ovine Abortion and Stillbirth due to Purulent Placentitis caused by Yersinia pseudotuberculosis. Vet. Pathol., 21:601-6, 1984.
80. KAY, B.A.; WACHSMUTH, K.; GEMSKI, P. New Virulence-Associated Plasmid in Yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol., 15:1161-63, 1982.
81. KAY, B.A.; WACHMUTH, K.; GEMSKI, P.; FELEY, J.C.; QUAN, T.J.; BRENNER, D.J. Virulence and Phenotypic Characterization of Yersinia enterocolitica Isolated from Humans in the United States. J. Clin. Microbiol., 17:128-38, 1983.
82. KNAPP, W. Pasteurella pseudotuberculosis unter besonderer Berücksichtigung ihrer humanmedizinischen Bedeutung. Ergeb. Mikrobiol. Exper. Ther., 32:196-269, 1959.
83. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; SOMMERS, H.M.

Enterobacteriaceae. In: DIAGNÓSTICO microbiológico.B. Aires. Editorial Medica Panamericana. 1983. cap. 2, p. 152-99.

84. KWAGA, J.K.P.; AGBONLAHOR, D.E.; ADESIYUN, A.A.; LOMBIN, L.H. The sensitivity to antimicrobial agents of species of Yersinia isolated from cattle and pigs in Nigeria. Vet. Microbiol., 12:383-8, 1986.
85. LAIR, W.J. & CAVANAUGH, D.C. Correlation of Autoglutination and Virulence of Yersinia. J. Clin. Microbiol., 11:430-2, 1980.
86. LANGFORD, E.V. Pasteurella pseudotuberculosis associated with abortion and pneumonia in the bovine. Can. Vet. J., 10:208-11, 1969.
87. LANGFORD, E.V. Pasteurella pseudotuberculosis infection in Western Canada. Can. Vet. J., 13: 85-7, 1972a.
88. LANGFORD, E.V. Yersinia enterocolitica isolates from animals in the Fraser Valley of British Columbia. Can. Vet. J., 13:109-13, 1972b.
89. LAWTON, W.D.; FUKUI, G.M.; SURGALA, M.J. Studies on the Antigens of Pasteurella pestis and Pasteurella pseudotuberculosis. J. Immunol., 84:475-9, 1960.
90. LAWTON, W.D.; ERDMAN, R.L.; SURGALA, M.J. Biosynthesis and Purification of V and W antigen in Pasteurella pestis. J. Immunol., 91:179-84, 1963.
91. LEISTNER, L.; HECHELMANN, H.; KASHIWAZAKI, M.; ALBERTZ, R. Nachweis von Yersinia enterocolitica in Faeces und Fleisch von Schweinen, Rindern und Geflügel. Die Fleichwirtschaft., 11:1599-1602, 1975.
92. MACLAGAN, R.M. & OLD, D.C. Haemagglutinins and Fimbriae in Different Serotypes and Biotypes of Yersinia enterocolitica. J. Appl. Bacteriol., 49:353-60 , 1980.

93. MAIR, N.S. Sources and serological classification of 177 strains of Pasteurella pseudotuberculosis isolated in Great Britain. J. Pathol. Bacteriol., 90:275-78, 1965.
94. MAIR, N.S. Yersiniosis in wildlife and its public health implications. J. Wildl. Dis., 9:64-71, 1973.
95. MAIR, N.S. Yersiniosis (Infections due to Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica). In: DISEASES transmitted from animals to man. Eds. W.T. Hubbert, W.F. McCulloch. 6.ed., Springfield, Charles C. Thomas, 1975, p. 174-85.
96. MAIR, N.S. & HARBOURNE, J.F. The Isolation of Pasteurella pseudotuberculosis from a bovine foetus. Vet. Rec., 75:559-61, 1963.
97. MAIR, N.S. & ZIFFO, G.S. Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from a foal. Vet. Rec., 94: 152 - 3, 1974.
98. MAIR, N.S.; FOX, E.; THAL, E. Biochemical Pathogenicity and Toxicity Studies of Type III Strains of Yersinia pseudotuberculosis Isolated from the Cecal Contents of Pigs. Contr. Microbiol. Immunol., 5:359-65, 1979.
99. MARTIN, W.J. & WASHINGTON II, J.A. Enterobacteriaceae. In: MANUAL of Clinical Microbiology. Ed. E.H. Lennette. 3.ed. Washington, D.C.. American Society for Microbiology, 1980. p.195-219.
100. MAZZINI. Pseudotuberculosis beim Rind. G. Soc. Acad. Vet. 1897, 758 apud KNAPP, W.. 1959.
101. MERCK Manual de Medios de Cultivo, Darmstadt, Merck, 1982, 189 p.
102. MESSERLI, J. Yersinia pseudotuberculosis, Erreger einer Mastitis beim Rind. Zentralb. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1 Abt. Orig. A., 222:280-82, 1972.
103. MOLLARET, H.H. Pseudotuberculose humaine et animale. relations possibles. Econom. Med. Animal, 5:353 -63, 1961.

104. MOLLARET, H.H. Conservation experimentale de la peste dans le sol. Bull. Soc. Pathol. Exot., 56: 1168 - 182, 1963.
105. MOLLARET, H.H. Sur la nomenclatura et la taxonomie du bacille de Malassez et Vignal. Int. Bull. Bacteriol. Taxon., 15:97-106, 1965.
106. MOLLARET, H.H. Pasteurelloses et Yersinioses. Gaz. Med. Fr., 1:3633-44, 1966.
107. MOLLARET, H.H. L'Infection humaine et animale a bacille de Malassez et Vignal, en France, de 1959 a 1967. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PSEUDOTUBERCULOSIS, Paris, 1967, Proceedings. Basel, Karger, 1968, p. 45-58.
108. MOLLARET, H.H. & PLACIDI, L. Le bacille de Malassez et Vignal chez le Mouton et la Chèvre. Rec. Med. Vet., 140: (7):515-23, 1964.
109. MOLLARET, H.H. & THAL, E. Genus XI Yersinia Van Loghem. In: BERGEY'S manual of determinative bacteriology. Ed. R.E. Buchanan, N.E., Gibbons. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p. 330-2.
110. MOLLARET, H.H.; BERCOVIER, H.; ALONSO, J.M. Yersinia. In: BACTERIOLOGIE Medicale. Eds. L.L. Minor, M. Véron. Paris, Flammarion, 1982. p. 299-303.
111. MONTEVERDE, J.J. & ROLDAN BONADEO, N. Aislamiento de Pasteurella pseudotuberculosis en una adenopatia supurada del equino. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2º, São Paulo, 1954. Anais. São Paulo, 1954. p. 189.
112. MORIN, J.C. & GSTACH, C. Un cas de pseudo-tuberculose à bacille de Malassez et Vignal chez le Mouton. Rec. Med. Vet., 143:1247-52, 1967.
113. NOSEDA, R.; BARDON, J.; MARTINEZ, A.; CORDEVIOLA, J. Yersinia pseudotuberculosis en una colonia de Cavia porcellus. In: REUNION ANUAL DE LA ASOCIACION ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO. 2º, Ciudad de Azul, 1987. Memórias. Ciudad de Azul, Arg., A.A.V.D., 1987. p: 68-70.

114. NUNES, M.P. & RICCIARDI, I.D. Detection of Yersinia enterocolitica Heat-Stable Enterotoxin by Suckling Mouse Bioassay. J. Clin. Microbiol., 13:783-86, 1981.
115. OBERHOFER, T.R. & PODGORE, J.K. Yersinia pseudotuberculosis: Use of Cold-Temperature Enrichment for Isolation. J. Clin. Microbiol., 11:106-8, 1980.
116. OBWOLO, M.J. Yersiniosis in the Bristol Zoo. Acta Zool. Pathol. Antverp., 64:81-90, 1976a.
117. OBWOLO, M. A review of Yersiniosis (Yersinia pseudotuberculosis infection). Vet. Bull., 46:167:71, 1976b
118. OBWOLO, M.J. & GRUFFYDD-JONES, T.J. Yersinia pseudotuberculosis in the cat. Vet. Rec., 100:424-25, 1977.
119. OKAMOTO, K.; INOUE, T.; ICHIKAWA, H.; KAWAMOTO, Y.; MIYAMA, A. Partial Purification and Characterization of Heat-Stable Enterotoxin Produced by Yersinia enterocolitica. Infect. Immun., 31:554-59, 1981.
120. OLIVEIRA, E.B.; WARTH, J.F.G.; KLUPPEL, M.E.; LEONARDI, M.L.; JOSÉ, W. Isolamento de Yersinia pseudotuberculosis em búfalos (Bubalus bubalis) no Estado do Paraná. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 12º, São Paulo, 1983. Anais. São Paulo, 1983.p. 121.
121. O'SULLIVAN, B.M.; ROSENFIELD, L.E.; GREEN, P.E. Concurrent infection with Yersinia pseudotuberculosis and Platynsomum fastosum in a cat. Aust. Vet. J. 52: 232-3, 1976.
122. PAI, C.H. & MORS, V. Production of Enterotoxin by Yersinia enterocolitica. Infect. Immun., 19: 908-11, 1978.
123. PAI, C.H. & DESTEPHANO, L. Serum Resistance with Virulence in Yersinia enterocolitica. Infect. Immun., 35:605-11, 1982.
124. PANEBIANCO, F.; IANNUZZI, L.; SCHIAVO, A.L.; MINNITI, A. Isolamento di Yersinia enterocolitica de suini e bovini. Ann. Fac. Med. Vet., 19:91-102, 1984.
125. PATERSON, J.S. & COOK, R. A method for the recovery

- of Pasteurella pseudotuberculosis from faeces. J. Pathol. Bacteriol., 85:241-2, 1963.
126. PERFUMO, C.J.; BRANDETTI, E.; PETRUCCELLI, M.A.; VENTURINI, M.C.; HERRERO, M.A.; VIDELA, P.; GARIGLIO, H. MENENDEZ, N.A. Infection por Yersinia pseudotuberculosis en cobayos del zoologico de la Plata. Estudio etiologico y anatopatologico. In: REUNION ANUAL DE LA ASOCIACION ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO, 2º, Ciudad de Azul, 1987. Memórias. Ciudad de Azul, Arg., A.A.V.D., 1987. p. 67-68.
127. PORTNOY, D.A. & FALKOW, S. Virulence-Associated Plasmids from Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. J. Bacteriol., 148:877-883, 1981.
128. PRPIC, J.K.; ROBINS-BROWNE, R.M.; DAVEY, R.B. Differentiation Between Virulent and Avirulent Yersinia enterocolitica Isolates by Using Congo Red Agar. J. Clinical Microbiol., 18:486-490, 1983.
129. PRPIC, J.K.; ROBINS-BROWNE, R.M.; DAVEY, R.B. In Vitro Assessment of Virulence in Yersinia enterocolitica and Related Species. J. Clin. Microbiol., 22:105-10, 1985.
130. PUEYO, J.M.; TERZOLO, H.R.; MICHEO, G.L. Aislamiento de Yersinia pseudotuberculosis serotipo O III de la mucosa intestinal de un novillo con enteritis. Rev. Med. Vet. (B. Aires), 68:259-61, 1987.
131. QUARTO, M.; ATTIMONELLI, D.; ARMENISE, E. Sulla diffusione della "Yersinia enterocolitica", Nota II. Richerche condotte in animali d'allevamento. Ig. Mod., 78:223-29, 1982.
132. QUEVEDO, J.M. Sobre un germen que provoca lesiones de pseudotuberculosis. Bol. Min. Agr. Nac., 36:99-100, 1934.
133. RIET-CORRÊA, A.F.; TURNES, C.G.; REYES, J.C.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C. Yersinia pseudotuberculosis Infection of Buffaloes (Bubalus bubalis). J. Vet. Diagn. Invest., 2:78-9, 1990.

134. RICCIARDI, I.D.; PEARSON, A.D.; SUCKLING, W.G.; KLEIN, C. Long-Term Fecal Excretion and Resistance Induced in Mice Infected with *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 21:342-44, 1978.
135. ROBINS-BROWNE, R.M. & PRPIC, J.K. Effects of Iron and Desferrioxamine on Infections with *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 47:774-79, 1985.
136. ROJAS, X.; ALONSO, O.; CHAHUAN, E. *Yersinia pseudotuberculosis* en cobayo. Rev. Inst. Salud Pública, 23: 137-8, 1982.
137. ROJAS, X.; ALONSO, O.; ENRIQUEZ, R. Yersiniosis en Animales. Arch. Med. Vet., 17:7-12, 1985.
138. RUSSEL, R.J. & SHILLING, P.W. Seudotuberculosis. In: temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio-El conejo. 2.ed. Rio de Janeiro, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1976, 31-2. (Serie de Monografias Cientificas y Técnicas, 4).
139. SARIDAKIS, H.O.; FERREIRA, A.J.P.; PELAYO, J.S.; FALCÃO, D.P. Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* de bezerros, na região de Londrina, Paraná, Brasil. Rev. Microbiol., 19:12-3, 1988.
140. SAUTU-RIESTRA, M.R. Sobre una seudo tuberculosis del cobayo. Rev. Fac. Med. Vet. (La Plata), 3:489 - 503. 1930.
141. SCHNEIDER, P.A. Evolution Des pseudotuberculoses Animales en Suisse de 1957 a 1966. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PSEUDOTUBERCULOSIS, Paris, 1967. Proceedings. Basel, Karger, 1968. p.59-62.
142. SLEE, K.J.; BRIGHTLING, P.; SEILER, R.J. Enteritis in cattle due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection Aust. Vet. J., 65:271-5, 1988.
143. SMITH, J.E. & THAL, E. A taxonomic study of the genus *Pasteurella* using a numerical technique. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 64:213-23, 1965.
144. SPERMAN, J.G.; HUNT, P.; NAYAR, P.S.G. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in a Cat. Can. Vet. J., 20: 361-4, 1979.

145. STEPHAN, J. (The serological relationships of strains of Pasteurella pseudotuberculosis and relates organisms). Abh. Med. Chem. Forschstatten I.G. Farbenindustrie A.G. 4:465-477, 1942 apud Vet. Bull., 16:16, 1946 [Abstract].
146. STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Principles and Procedures of Statistics. New York; Toronto; London, Mc Graw-Hill, 1960, 481 p.
147. SUZUMURA, L.Y. Mortalidade de bovinos por Yersinia pseudotuberculosis do Grupo O III na região Noroeste do Estado do Paraná. Informativo do CRMV-3 (Curitiba-Pr.) 2(738):2-3, 1984.
148. TASLER, G.R.W.; HYNE, R.H.J.; HARTLEY, W.J. Yersinia pseudotuberculosis infection in a Lion. Aust.Vet. J., 55:296, 1979.
149. THAL, E. & KNAPP, W. A revised antigenic scheme of Yersinia pseudotuberculosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENTEROBACTERIAL VACCINE, Berne, 1968. Proceedings, Basel, Karger, 1971, p. 219-222.
150. THAL, E. Genus Yersinia. Veterinarmedizinische Bedeutung und bakteriologische Diagnostik. Berl.Muench Tierarztl. Wochenschr., 87:212-14, 1974.
151. TINAJERO, R.G. & PONCE, R.C. Recoleccion y envio de muestras. In: Manual ilustrado de tecnicas de laboratorio utilizadas en bacteriologia y micologia veterinarias. Cuatitlan, Red intermamericana de laboratorios de salud animal. 1988. p.6-50.
152. TRENCHI, H.; DE SOUZA, C.G.; SUSVIELA, J.L.; OLIVEIRA, N. Pseudotuberculosis en chinchillas. Primer Diagnóstico e informe en Uruguay. Ann. Fac. Vet. Montevideo, 15, 1978.
153. TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; FUKUDA, T.; HIRAYAMA, N; SA NEKATA, T.; TAKAHASHI, K.; KUBOTA, M. Isolation of Yersinia enterocolitica from pigs. Jpn. J. Vet. Med. Assoc., 27(6):278-81, 1974.
154. TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; FUKUDA, T.; KUBOTA, M.; IMA MURA, M.; ITAGAKI, K.; YAMAOKA, K.; WAKATSUKI, M.

- Studies on Yersinia pseudotuberculosis. IV. Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from healthy swine.
Jpn. J. Vet. Sci., 38:549-552, 1976.
155. TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; KAWAOKA, Y.; MARUYAMA, T. Characterization and Pathogenicity of Yersinia pseudotuberculosis Isolated from Swine and Other Animals J. Clin. Microbiol., 19:754-56, 1984.
156. TZIPORI, S. Mixed Diarrhoeal Infection in Calves: The Relative Importance of Interacting enteropathogens. In: LABORATORY Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea. Eds. P.W.de Leeuw, P.A.M. Guinée. The Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, 1981. v. 13, p. 185-190.
157. ULYANOVA, N.I. On the natural nidality of Pseudotuberculosis. J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 32: 87-91, 1961.
158. VAN NOYEN, R.; VANDEPITTE, J.; WAUTERS, G. Nonvalue of Cold Enrichment of Stools for Isolation of Yersinia enterocolitica Serotypes 3 and 9 from Patients J. Clin. Microbiol., 11:127-31, 1980.
159. WALLS, I.T. & LEVETT, P.N. Isolation of Yersinia species from faeces of Dairy cattle. J. Appl. Bact., 65: XXI, 1988.
160. WARTH, J.F.G.; KLÜPPEL, M.E.A.; OLIVEIRA, E.B. Isolamento de Yersinia pseudotuberculosis do Grupo O III, associado a surtos de diarréia em bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19º, Belém, 1984. Anais. Belém, 1984. p. 169.
161. WARTH, J.F.G.; KLÜPPEL, M.E.A.; MOURA, S.T. Isolamento de Yersinia enterocolitica de enterite hemorrágica bovina (Bos taurus) no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 13ª, São Paulo, 1985. Anais. São Paulo, 1985.
162. WATSON, W.A. & HUNTER, D. The isolation of Pasteurella pseudotuberculosis from an Ovine Foetus. Vet. Rec., 72:770-2, 1960.

163. WEBER, V.A. & LEMBKE, C. Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* bei Schlachttieren. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr., 94:5-8, 1981.
164. WEBER, A. (Serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from various animal species in the Federal Republic of Germany). Deutsch. Tierarztl. Umsch., 43:265-7, 1988.
165. WEISSFELD, A.S. & SONNENWIRTH, A.C. *Yersinia enterocolitica* in Adults with Gastrointestinal Disturbances: Need for Cold Enrichment. J. Clin. Microbiol., 11:196-7, 1980a.
166. WEISSFELD, A.S. & SONNENWIRTH, A.C. Rapid Isolation of *Yersinia* spp. from Feces. J. Clin. Microbiol., 15:508:10, 1980b.
167. WETZLER, T.F. & HUBBERT, W.T. "Pasteurella pseudotuberculosis" in North America. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PSEUDOTUBERCULOSIS, 20. Paris, 1967. Basel. Karger, 1968. p. 33-44.
168. WETZLER, T.F. Seudotuberculosis. In: ENFERMIDADES Infecciosas de los Mamiferos Salvajes. Ed. J.W. Davis. Zaragoza, Acribia, 1972. p. 272-84.
169. WINBLAD, S. Immune Response to *Yersinia* and Pasteurella. In: MANUAL of clinical immunology. Eds. N.R. Rose, O. Friedman, Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1976. p. 256-301.
170. WOOLEY, R.E.; SHOTTS, E.B.; MCCONNELL, J.W. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Selected Animal Species. Am. J. Vet. Res., 41:1667-8, 1980.
171. YANAGAWA, Y.; MARUYAMA, T.; SAKAI, S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from apparently healthy dogs and cats. Microbiol. Immunol., 22(10):643-6, 1978.
172. ZAMORA, J.; MUÑOZ, A.; ALONSO, O. Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus dem Blinddarminhalt von Rindern Sud-Chiles. Zentralbl. Veterinaermed. Rheie B., 28:503-5, 1981.

173. ZEN-YOJI, H.; SAKAI, S.; MARUYAMA, T.; YANAGAWA, Y.
Isolation of Yersinia enterocolitica and Yersinia
pseudotuberculosis from Swine, cattle and Rats at an
Abattoir. Jpn. J. Microbiol., 18:103-5, 1974.