

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária

REAÇÕES SOROLÓGICAS CRUZADAS ENTRE *YERSINIA ENTEROCOLITICA*
SOROTIPO 9 e *BRUCELLA* sp. EM BOVINOS E SUÍNOS

Norma dos Santos Lázaro

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITARIA



000097238210

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

4/03/07

Belo Horizonte
Minas Gerais
1980

Norma dos Santos Lázaro

T636.012
27312
1980



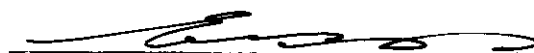
REAÇÕES SOROLÓGICAS CRUZADAS ENTRE YERSINIA ENTEROCOLITICA
SOROTIPO 9 e BRUCELLA sp. EM BOVINOS E SUÍNOS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1980

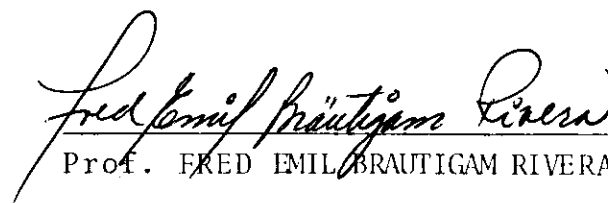
APROVADA EM 30/09/1980



Prof. ERNESTO HOFER
-Orientador-



Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA



Prof. FRED EMIL BRAUTIGAM RIVERA

L431r Lázaro, Norma dos Santos, 1949-
Reações sorológicas cruzadas entre *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e *Brucella* sp em bovinos e suínos. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1980.
ix + 72p. ilustr.

Bibliografia

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Doença animal. 2. Soro-aglutinação. 3. Diagnóstico. 4. Bovino. 5. Suíno. 1. Título

CDD- 636.089 607 5

Dedico este trabalho
aos meus pais, *in memoriam*
e aos meus irmãos
pelo estímulo recebido.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Referência de Enterobactérias e Vibrio do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz e ao Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao nosso Orientador Prof. ERNESTO HOFER, Chefe do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pelo interesse, estímulo, sugestões e ensinamentos.

Aos docentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais, representados pelos Professores ÉLVIO CARLOS MOREIRA e FRED EMIL BRAUTIGAM RIVERA.

Ao Prof. PEDRO CARVALHO RODRIGUES da Universidade Federal Fluminense pela colaboração prestada na análise estatística deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro na pessoa do Prof. MARIO RUBENS DE MELLO, pela consideração dispensada durante o período de execução do trabalho de Tese.

Aos membros do Departamento de Bacteriologia(Laboratório de Referência de Enterobactérias e Vibrio) do Instituto Oswaldo Cruz, em especial aos Doutores CLAUDE ANDRÉ SOLARE e DÁLIA DOS PRASERES RODRIGUES, pela amizade e o apoio que sempre demonstraram.

Ao Programa de Educação Agrícola Superior (PEAS) pelo auxílio financeiro concedido sob a forma de bolsa de estudos, para atendimento dos compromissos decorrentes do Curso de Pós-Graduação.

A quantos direta ou indiretamente favoreceram a elaboração do presente trabalho.

RESUMO

Visando demonstrar as interferências antigênicas entre *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 nos testes de rotina empregados para o diagnóstico da brucelose, foram analisados 245 soros de bovinos discriminados quanto à idade e estado de imunização contra a brucelose e, 119 soros de suínos. Os espécimens dos animais em estudo foram submetidos aos testes de soro-aglutinação rápida, soro-aglutinação lenta e Card Test, para a detecção de animais reagentes à *Brucella* sp. e à prova de soro-aglutinação lenta para *Yersinia enterocolitica* 9.

Além desses dois microorganismos, os soros foram analisados frente ao sorotipo 3 de *Y. enterocolitica* que participou neste estudo com dupla função: a primeira na tentativa de demonstrar o não relacionamento antigênico com membros do gênero *Brucella* e, em segundo plano, visando assinalar a possível atuação deste sorotipo nas espécies animais estudadas.

A análise dos resultados do inquérito sorológico sugeriram algumas deduções:

- foram detectadas reações cruzadas em títulos elevados para *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9, concentrando-se mais acentuadamente nos suínos;

- a prova de soro-aglutinação lenta foi a que melhor evidenciou as interferências, embora estas reações cruzadas tenham sido também reveladas em menor intensidade nos outros testes empregados;

- a soro-aglutinação rápida e o Card Test foram os métodos que melhor caracterizaram a infecção por *Brucella* sp. nos suínos, ao passo que nos bovinos destacou-se a soro-aglutinação rápida;

- foram detectados anticorpos aglutinantes para *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9, nos bovinos e suínos, sem, entretanto, apresentar predomínio de um dos tipos em relação aos bovinos;

- no cômputo geral, observou-se maior número de suínos reagentes ao sorotipo 9 de *Y. enterocolitica* do que ao seu homônimo 3.

Salienta-se que nenhum dos testes empregados e analisados, foram capazes de discriminar sorologicamente a infecção ou doença por *Brucella* sp. ou *Y. enterocolitica* nos hospedeiros. Este aspecto implica em estudos futuros sobre novos métodos, acessíveis à rotina, que venham permitir um diagnóstico sorológico mais específico.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Colheita dos espécimens	11
3.2. Antígenos	12
3.2.1. Antígenos de <i>Brucella abortus</i>	12
3.2.2. Antígenos de <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> sorotipos 3 e 9	12
3.3. Testes sorológicos	14
3.3.1. Provas de aglutinação de <i>Brucella</i> sp.	14
3.3.2. Provas de soro-aglutinação lenta para <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> sorotipos 3 e 9	15
3.4. Tratamento estatístico	15
4. RESULTADOS	17

	<u>Página</u>
5. DISCUSSÃO	41
5.1. Relação soro-aglutinação rápida	
com <i>Yersinia enterocolitica</i> 9	44
5.1.1. Bovinos não vacinados	44
5.1.2. Bovinos vacinados	45
5.1.3. Suínos	45
5.2. Relação soro-aglutinação lenta	
com <i>Yersinia enterocolitica</i> 9	46
5.2.1. Bovinos não vacinados	46
5.2.2. Bovinos vacinados	47
5.2.3. Suínos	47
5.3. Relação Card Test com <i>Yersinia</i>	
<i>enterocolitica</i> 9	48
5.3.1. Bovinos não vacinados	48
5.3.2. Bovinos vacinados	49
5.3.3. Suínos	50
5.4. Relação <i>Yersinia enterocolitica</i>	
3 com <i>Yersinia enterocolitica</i> 9	51
5.4.1. Bovinos não vacinados	51
5.4.2. Bovinos vacinados	51
5.4.3. Suínos	52
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

SIGLAS

BM = Banho Maria	SAR = Soro-aglutinação rápida
RBP = Rosa Bengala em Placa	Y.e.3 = <i>Yersinia enterocolitica</i> 3
SAL = Soro-aglutinação lenta	Y.e.9 = <i>Yersinia enterocolitica</i> 9

1. INTRODUÇÃO

À primeira vista, a semelhança entre *Yersinia pseudotuberculosis* (bacilo de malassez e Vignal) e *Yersinia enterocolitica* poderá dar impressão de que suas histórias evoluíram paralelamente. Todavia, o conhecimento sobre o primeiro microrganismo, no campo da Veterinária, seja sob o prisma bacteriológico ou sob a esfera clínico-patológica, representa uma experiência antiga dentro desse ramo profissional.

Quanto a *Yersinia enterocolitica*, poder-se-á considerar um fenômeno extraordinariamente interessante, calcado no seu aparecimento explosivo durante 1958 (WAUTERS, 1970) tendo por cena a Patologia Veterinária, que forneceu os elementos para a divulgação e reconhecimento posterior de sua atuação na área da medicina humana.

Curiosamente, a evolução das pesquisas sobre a atuação de *Yersinia enterocolitica* sobre o homem revelou um fato inusitado, exteriorizado pelas reações cruzadas observadas com um outro gênero bacteriano, isto é, *Brucella*, de grande importância sanitária e econômica no campo da veterinária.

Considerando a destacada intervenção de membros do gênero *Brucella* em nossos rebanhos, seria de bom alvitre ter uma noção exata até que ponto as infecções de *Yersinia enterocolitica* possam representar um óbice na interpretação do arraigado processo de diagnóstico sorológico da bru-

celose, inclusive, recorrendo-se à técnica adotada mais recentemente, capaz de avaliar ou discernir a natureza dos anticorpos envolvidos.

O propósito fundamental deste trabalho foi de demonstrar o grau de interferência antigênica entre *Yersinia enterocolitica* 9 e *Brucella* sp., recorrendo-se, como processo de visualização deste fenômeno, às técnicas usualmente empregadas no diagnóstico sorológico da brucelose e da yersiniose. Considerando que as observações experimentais são unâmines em configurar este relacionamento antigênico entre os microrganismos, encetou-se uma verificação no campo prático, tentando analisar até que ponto este fato possa ser caracterizado como de importância para a interpretação de resultados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A *Yersinia enterocolitica* representa um microrganismo de recente individualização, que, sob os prismas bacteriológico e patológico, qualquer que seja a fonte de infecção considerada, apresenta vários aspectos similares à *Yersinia pseudotuberculosis* (bacilo de Malassez e Vignal).

Do ponto de vista da evolução histórica, apresentar-se-ão aspectos que mais influíram para o conhecimento desta bactéria, citando-se as observações iniciais de SCHLEIFSTEIN & COLEMAN em 1939 e complementadas em 1943, sobre as características biológicas de cinco amostras de um microrganismo isolado de material clínico humano e rotulado como "não identificado". Na análise posterior dos autores, estas estirpes receberam a denominação de *Bacterium enterocoliticum*, baseado nas confrontações com *Actinobacillus lignieresii* e bacilo de Malassez e Vignal. Aliás, corroborando as observações anteriores, HASSIG et alii em 1949 (MOLLARET & DESTOMBES, 1964), verificaram que clinicamente as infecções por *Bacterium enterocoliticum* em nada diferiam daquelas provocadas pela *Yersinia pseudotuberculosis* e inclusive com a mesma projecção no quadro patológico.

Apesar desses resultados, todos os autores subsequentes que analisaram esta bactéria preocuparam-se ba-

sicamente em recomendar outras denominações, como por exemplo: *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo b (DICKINSON & MOQUOT, 1961); *Pasteurella* X (DANIELS & GOUDZWAARD, 1963); "Germe X", dado por MOLLARET em 1964, demonstrando uma atitude reservada para a inclusão no gênero *Pasteurella* e propondo inclusive o nome genérico de *Yersinia*, admitido por Van LOGHEM (1945, 1946). Ainda em 1964, FREDERIKSEN, adotando esta tendência taxonômica, sugere o nome específico de enterocolítica, para este microrganismo. Desta forma, foi criado o gênero *Yersinia* constituído das espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolítica*, membros da família Enterobacteriaceae, de acordo com a orientação sistemática imprimida por FREDERIKSEN (1964).

Quanto a sua distribuição geográfica poder-se-á caracterizar como cosmopolita, pois tem sido reportada em quase todos os continentes, atingindo uma gama imensa de fontes de infecção. Estas estão representadas principalmente por mamíferos de hábitos domésticos ou selvagem, como chinchila, lebre, cão, gato, porco, equino, bovino, caprino, ovino, primata (inclusive sagüis, no Brasil) e aves (KNAPP & THAL, 1963; MOLLARET et alii, 1965, 1966; NILEIN, 1967, 1969; GIORGI et alii, 1969; MAIR et alii, 1970; MCCLURE et alii, 1971; HUBBERT, 1972; LANGFORD, 1972; KROGSTAD et alii, 1972; AHVONEN et alii, 1973; WINBLAD, 1973; TSOBOKURA et alii, 1973, 1974; VANDEPITTE et alii, 1973; PEDERSEN, 1976; VASCHENOK et alii, 1977).

Em relação à estrutura antigênica de *Yersinia enterocolítica*, cabe o mérito inicial a WINBLAD (1967), que ao analisar 109 amostras caracterizou oito tipos sorológicos, através da determinação de fatores somáticos. Nesta oportunidade, o autor verificou que a maioria das estirpes de origem humana enquadravam-se no grupo sorológico III, assim como, neste mesmo ano, relata um novo sorotipo que recebeu a identificação antigênica IX. Posteriormente, num estudo das estruturas antigênicas somáticas e flagelares

de *Yersinia enterocolitica* WAUTERS et alii (1971) classificaram 27 sorotipos representando 17 fatores O e 16 fatores H. Em 1972, estes mesmos autores, através da análise antigênica de uma série de amostras de *Y. enterocolitica*, caracterizaram novos fatores O (O:18 a O:34) e H (r.s.t.). Em continuidade a essa linha de pesquisa, AHVONEN et alii (1968 e 1969), CORBEL & CULLEN (1970); FRIBOURG-BLANC (1970) e HURVELL (1972, 1973), evidenciaram um fenômeno extremamente interessante da reação antigênica cruzada entre a *Y. enterocolitica* sorotipo 9* e membros do gênero *Brucella*, em particular *B. abortus*.

Convém salientar que DIAZ et alii (1968), num estudo sobre antígenos da parede celular de *Brucellae*, descreveram que as frações antigênicas "A" e "M" representam um complexo de elevado peso molecular, constituído de uma proteína e um lipopolissacáride e cujas proporções são intimamente dependentes da espécie ou mesmo do biotipo de *Brucella*. Assinalaram ainda (1970) que os determinantes comuns à *Brucella* e *Y. enterocolitica* 9 parecem estar presentes no complexo.

Corroborando a participação do complexo antigênico na imunogenicidade de *Brucella*, LEONG et alii (1970), ao analisarem as amostras rugosas de *Brucella canis* e *Brucella ovis*, verificaram a discreta ocorrência ou mesmo a ausência de complexo lipopolissacáride nestas estirpes.

Em seqüência, CORBEL & CULLEN (1970) confirmaram as reações cruzadas em soros de bovinos inoculados com *B. abortus* e *Y. enterocolitica* 9, analisados nos testes de so-

* Todos os sorotipos de *Y. enterocolitica* são representados sob numeração arábica

ro-aglutinação, anti-globulina de Coombs, fixação de complemento e Rosa Bengala em placa, (Card Test) sendo ainda complementados pela técnica de imunodifusão. Aliás, no teste de imunodifusão, com soros de coelho e de bovino, foram detectados altos títulos de anticorpos específicos para tais organismos, porém, não apresentando um grau de sensibilidade suficiente para seu emprego usual no diagnóstico sorológico.

A utilização de um método quantitativo em placa, tendo como antígenos *Brucella abortus* e *Yersinia enterocolitica* 9, corados pelo Rosa Bengala, tornou possível a diferenciação dos anticorpos formados pelos dois microrganismos. As experiências de absorção cruzada confirmaram a especificidade e sensibilidade do teste. Convém salientar os trabalhos de MORGAN (1967, 1969, 1971); NICOLETTI (1967), HRISTOFOROV (1972). PILET et alii (1972) e ČERNYŠEVA et alii (1977) que, ao analisarem diversos testes para o diagnóstico sorológico da brucelose, apontaram o Card Test como um método específico e mais sensível do que o processo de aglutinação em placa e em tubo.

DIAZ & DORRONSORO (1971), recorrendo à técnica de imunodifusão em gel, visaram a detecção de anticorpos frente aos antígenos específicos do gênero *Brucella* ou do gênero *Yersinia*. Os resultados obtidos mostraram que as frações antigênicas A e M desenvolviam uma reação de identidade parcial com o antígeno somático "O" de *Y. enterocolitica* 9. Demonstraram também que, em soros de pacientes com brucelose e yersiniose, existiam anticorpos específicos contra antígenos particulares dos gêneros *Brucella* e *Yersinia*.

Complementando esta experiência, DIAZ & LEVIEUX (1972), citados por DIAZ (1974), assinalaram que as frações antigênicas A e M do lipopolissacáride de *Brucella* foram consideradas mais importantes nas técnicas sorológicas de aglutinação, Coombs e Rosa Bengala e que os anticorpos detectados nestas reações foram absorvidos pelo lipopolissa-

cáride de *Yersinia enterocolitica* 9.

HURVELL (1972) observou reações cruzadas entre *Y. enterocolitica* 9 e *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis* e *Brucella neotomae* em testes de imunodifusão em gel e imunoeletroforese, porém, não com *Brucella ovis* e *Brucella canis*, por serem amostras naturalmente rugosas. Os testes de absorção e as linhas de precipitação resultantes sugeriram aos autores que os determinantes antigênicos comuns à *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9 parecem estar associados com a camada externa da parede celular e ao complexo lipopolissacáride dos microrganismos.

CORBEL (1973a), na tentativa de isolar o antígeno responsável pela reação cruzada de *Y. enterocolitica* 9, visando, com isto, determinar suas propriedades imunológicas, pondera que a fração A foi a de maior significado para a indução de anticorpos aglutinantes, fixadores do complemento e precipitantes e tendo capacidade reacional com *B. abortus* em cobaias, camundongos, coelhos e bovinos.

Este antígeno, bem como os extratos de *B. abortus* foram capazes de provocar uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado em cobaias, infectadas com *B. abortus* e *Y. enterocolitica* 9. Os extratos de *B. abortus*, isentos de antígenos reagentes cruzados, produziram alterações dérmicas em cobaias infectadas por *B. abortus*, mas não naquelas sensibilizadas por *Y. enterocolitica* 9. As inoculações em cobaias com o componente antigênico de *Y. enterocolitica* 9 e os desafios com *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, sugerem que o componente antigênico responsável pela reação cruzada de *Y. enterocolitica* 9 é distinto do antígeno protetor de brucelas lisas, embora seja capaz de induzir altos títulos de anticorpos comuns e evidenciar reações cruzadas ao nível de estado de hipersensibilidade.

CORBEL (1973b) demonstrou que as imunoglobulinas 19 S IgM e 7 S IgG₁ e IgG₂ foram produzidas em resposta aos antígenos reagentes cruzados de *Y. enterocolitica* 9

com *Brucella* sp inoculados em bovinos, sendo que os mais altos títulos desses anticorpos foram detectados nos testes de aglutinação e de antiglobulina de Coombs. Os anticorpos fixadores de complemento e precipitantes, reagentes cruzados com *Brucella* sp, foram transitórios, não atingindo altos títulos. Em contraposição, na infecção por *B. abortus*, foram encontrados títulos mais elevados de anticorpos nos métodos de fixação de complemento e de precipitação que, por sinal, persistiam por longo período. Em conclusão, salienta o autor que somente um teste quantitativo em placa de Rosa de Bengala tornou possível a diferenciação imunológica das duas infecções. Por outro lado, LEVIEUX (1974), estudando as propriedades sorológicas das imunoglobulinas anti-*Brucella* através dos testes de aglutinação, fixação de complemento e Rosa Bengala em placa, verificou que a IgG₂ foi ativa nos testes de aglutinação mas não no de Rosa Bengala e fixação de complemento. Outrossim, assinala que a IgG₁ foi inativa nos testes de aglutinação sendo, porém, ativa nos testes de Rosa Bengala em placa e fixação de complemento.

Ainda CORBEL & DAY (1973) examinando soros de bovinos inoculados com *B. abortus* e *Y. enterocolitica* sorotipo 9, recorrendo às técnicas de imunofluorescência indireta e inibição da imunofluorescência, acentuaram que estes processos foram efetivos para a diferenciação dos anticorpos induzidos especificamente por estes organismos, apenas quando os soros revelavam altos títulos. Por outro lado, as técnicas em análise não foram suficientemente capazes de evidenciar a sensibilidade necessária em soros com baixos títulos, mesmo com os microrganismos homólogos.

HURVELL (1973), comparando a atividade aglutinante dos anticorpos 19 S e 7 S resultantes da imunização em coelhos com células totais e lipopolissacárides de *B. abortus* e *Y. enterocolitica* 9, observou que os anticorpos 19 S apresentavam maior tendência às reações cruzadas do

que seu homônimo 7 S.

KARLSSON et alii (1973), num estudo com diferentes sorotipos de *Y. enterocolitica*, aplicando a técnica de imunofluorescência indireta, encontraram fortes reações cruzadas entre os tipos 1, 2, 3; 2, 3 e 3, sendo que os outros sorotipos evidenciaram somente reações específicas com o tipo homólogo. Assim como, ao utilizar a técnica de imunofluorescência direta, verificaram uma forte reação cruzada entre *B. abortus*, *B. melitensis* e *Y. enterocolitica* 9.

JONES et alii (resultados não publicados), citados por DIAZ (1974), observaram que o lipopolissacáride de *Y. enterocolitica* 9 e que as frações antigênicas A e M do gênero *Brucella*, fixam o complemento em presença de soros procedentes de vacas infectadas por *Brucella*.

DIAZ (1974), assinalou que por meio da técnica de imunoeletroforese foi possível analisar o relacionamento antigênico entre o gênero *Yersinia* e outras bactérias Gram negativas. Admite que *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* contenham uma estrutura antigênica muito similar, sendo que as três espécies também são possuidoras de componentes antigênicos comuns com membros da família Enterobacteriaceae e discreta identidade antigênica com *Pasteurella multocida*.

Projetando suas observações experimentais para o campo prático, DIAZ analisou 82 soros de origem bovina, anotando a presença de duas linhas de precipitação frente ao antígeno de *Yersinia* e aos antígenos de diferentes espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae.

Este aspecto mencionado foi discutido e comprovado por CORBEL (1975a) (citado por CORBEL, 1975b), que demonstrou a ocorrência de anticorpos reagentes cruzados entre *B. abortus* e *Y. enterocolitica* 9 com o antígeno somático 30, de amostras de *Salmonella* do grupo sorológico N do esquema de KAUFFMANN-WHITE.

MARX et alii (1975) descreveram um método basea-

do na inibição da aglutinação, enfatizando-o como processo de diagnóstico sorológico diferencial entre as infecções por *B. abortus* e *Y. enterocolitica* 9. Salientam que o antígeno isolado de *Brucella* era constituído de um polissacáride (N-acetil glucosamina, glicose, manose e ácido 2-ceto-3 deoxioctônico), uma proteína e um fosfoglicéride, estando ausente o lípide A. Os oligossacárides, contendo N-acetil glucosamina, glicose e galactose, foram isolados de cadeia lateral específica do lipopolissacáride de *Yersinia enterocolitica*. Os constituintes do lípide A também foram identificados em *Y. enterocolitica*.

HURVELL et alii (1976), na tentativa de estabelecer um método de diagnóstico diferencial entre *Yersinia enterocolitica* do grupo V nas diversas espécies de *Brucella* manifestam a possibilidade da utilização da técnica ELISA. Demonstraram que nos experimentos de inibição do sistema ELISA, os determinantes da reação-cruzada de *Y. enterocolitica* grupo V, são periodato sensíveis, fato este não ocorrente em *B. abortus*.

A projeção de todas as intercorrências antigênicas teve no trabalho de BOCKEMUHL & ROTH (1978), uma aplicabilidade, pois, estes autores observaram que títulos de anticorpos contra *Brucella* em suínos foram provavelmente originadas por infecções sub-clínicas de *Y. enterocolitica* 9.

Quanto a bibliografia nacional que tenha retratado algum aspecto das relações antigênicas de *Yersinia enterocolitica* com outros microrganismos, cita-se apenas a pesquisa experimental de FALCÃO et alii (1978). Estes autores enfatizam as relações antigênicas com certos fatores somáticos de *Salmonella*.

Mais recentemente, FALCÃO et alii (1979), apresentam os resultados de um inquérito sorológico em 1.554 suínos, oriundos dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. A análise do nível de aglutininas anti-*Y. enterocolitica* sorotipos 0₃, 0₅ e 0₉, evidenciaram 31,3% de soros reagentes para um ou mais tipos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Na presente investigação foram analisadas 245 amostras de soros sanguíneos de bovinos, provenientes de diferentes áreas do Estado do Rio de Janeiro.

Foram anotados os detalhes em relação à idade, por sinal caracterizada da forma mais simplificada possível, em adultos e jovens, considerando como faixa etária limite de diferenciação, a idade de três anos.

Outro aspecto de suma importância se concentrou na observação do processo de imunização contra a brucelose. Assim, no cômputo geral, foram estudados 185 soros de bovinos não vacinados (23 jovens e 162 adultos) e 60 de bovinos vacinados (9 jovens e 51 adultos).

Quanto aos suínos, totalizando 119 soros examinados, não foi possível adotar a especificação da origem e idade, em decorrência do número vultoso de amostras sem estas informações (47 soros). Estes dados foram coligidos em 72 soros, sendo 39 colhidos em animais jovens e 33 em adultos, todos oriundos do Estado do Rio de Janeiro.

3.1. Colheita dos espécimens

Os soros foram obtidos através da punção venosa

da veia jugular em bovinos e da veia marginal da orelha em suínos, retirando-se cerca de 5 a 10 ml de sangue. Depois de coagulado o sangue, o soro era transferido para tubos esterilizados e centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm. Como etapa subsequente, os soros sofriam a inativação a 56°C durante 30 minutos em banho-Maria e foram conservados à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

3.2. Antígenos

3.2.1. Antígenos de *Brucella abortus*

Para a técnica de aglutinação rápida ou em placa, foi utilizado o antígeno concentrado e corado de *Brucella abortus*, confeccionado e padronizado pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, MG, de acordo com a técnica Standard Internacional, estabelecida pela OMS/FAO/OIE.

Em relação à prova de aglutinação lenta ou em tubo, o antígeno foi preparado a partir da amostra *Brucella abortus* 1119-3, sendo standardizada segundo as normas preconizadas por ALTON & JONES (1969). Associado às duas provas clássicas, empregou-se o antígeno acidificado e corado pelo Rosa Bengala, comercializado por Becton, Dickison and Company, USA (Card Test).

3.2.2. Antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

As amostras empregadas de *Y. enterocolitica* foram obtidas do Prof. S. Winblad, Institute of Clinical Bacteriology, Malmö*, Suécia, sob as seguintes especificações:

* (MY. Malmö *Yersinia enterocolitica* collection)

- M.Y.1. - Biotipo 4, sorotipo 3 e fagotipo Y.II.
M.Y.79. - Biotipo 3, sorotipo 9 e fagotipo não determinado.

Convém salientar, como particularidade de suma importância para a obtenção dos antígenos de *Yersinia enterocolitica*, o problema crucial da tendência acentuada destes microrganismos em exteriorizar a fase rugosa. Adotando-se a orientação de WINBLAD (1968), verificou-se que a faixa de temperatura compreendida entre 22 a 29°C favorece o reconhecimento das colônias em fase lisa, pela sua predominância. Em contraposição, a temperatura de 37°C evidencia quase que essencialmente uma população de microrganismos formadores de colônias rugosas.

Após a caracterização das amostras em fase lisa, reconhecidas pela termo-estabilidade da suspensão e pelo teste da tripaflavina, estas foram cultivadas para a obtenção dos antígenos somáticos segundo as orientações de WINBLAD (1968), WAUTERS (1970) e HOFER (dados não publicados). Pelos resultados mais satisfatórios da análise experimental, foi adotado o terceiro processo.

Método de HOFER

- 1) Semeadura e cultivo em agar Mueller-Hinton (Difco) e incubada à temperatura ambiente por 24-48 horas.
- 2) A suspensão do crescimento é realizada pela solução salina contendo 0,2 g% de Trifeniltetrazólio (Difco).
- 3) A suspensão é incubada a 37°C durante 4-6 horas, o tempo suficiente para a redução do TTC a formazana (evidenciada pela coloração avermelhada).
- 4) Lavar três vezes em solução salina por centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos.
- 5) Adicionar ao depósito corado, cerca de 10 ml da seguinte solução, previamente esterilizada a 121°C por 30 minutos:

Glicerol P.A. 1 ml
 Fenol P.A. (líquido) . . . 1 ml
 Solução de salina a 0,9% . 98 ml

- 6) Faz-se a diluição em salina fenicada a 0,3 g% antes de usar, de modo a obter turvação correspondente ao tubo 2 da escala de McFarland (6×10^8 bactérias/ml). A suspensão original permanece estável até três meses.

Em estudos preliminares, utilizou-se uma das etapas do processo de Wauters, isto é, após a redução do tetrazólio a suspensão corada foi aquecida a 100°C em B.M. durante duas horas. Todavia, os títulos aglutinantes obtidos em presença dos anti-soros de *Yersinia enterocolitica* 3 e 9 com este antígeno foram inferiores aos da suspensão antigênica supramencionada, além de demonstrar estabilidade pouco duradoura (menos de 30 dias).

3.3. Testes sorológicos

3.3.1. Provas de aglutinação de *Brucella* sp.

Para a detecção dos anticorpos anti-*Brucella* nos soros dos animais examinados, empregaram-se as técnicas de soro-aglutinação rápida em placa e soro-aglutinação lenta (tubos), realizadas e interpretadas segundo as especificações apresentadas por ALTON et alii (1976). Quanto ao processo que utiliza o antígeno de *Brucella* acidificado e corado pelo Rosa Bengala, genericamente identificado como Card Test, adotaram-se para a interpretação dos resultados, as recomendações ditadas por NICOLETTI (1967). Convém salientar, que esta é uma prova tipicamente qualitativa, evidenciando apenas as reações positivas ou negativas, isto é, presença ou ausência de aglutinação.

Para a interpretação dos resultados nas provas rápida e lenta para o diagnóstico de brucelose, foram considerados positivos os títulos ≥ 100 e ≥ 80 para os bovinos não vacinados e ≥ 200 e ≥ 160 para aqueles vacinados. Quanto aos suínos, o limiar de positividade para as duas provas situou-se em ≥ 50 e ≥ 40 , respectivamente.

3.3.2. Prova de soro-aglutinação lenta para *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

Em princípio, vários ensaios foram realizados com o intuito de obter uma técnica padronizada, suficientemente sensível e estável, para a detecção das aglutininas anti-*Yersinia enterocolitica*. Desta forma, como já se teve oportunidade de frisar e remediar os problemas relacionados na obtenção e estabilização dos antígenos, as atenções nesta fase se concentraram precipuamente nos parâmetros da temperatura e tempo de exposição do binômio antígeno-anticorpo. Para tanto, foram utilizados anti-soros somáticos específicos obtidos através de inoculação por via venosa em coelhos, dos antígenos somáticos, apresentando uma concentração de 15×10^8 bactérias por ml (WAUTERS, 1970).

Via de regra, os títulos obtidos variaram entre 1/640 a 1/2560 nos anti-soros glicerinados e conservados entre 4 a 10°C durante 30 dias.

Dentre as várias alternativas de temperatura e de tempo de incubação experimentadas, obtiveram-se títulos aglutinantes mais expressivos com a permanência prévia do sistema, durante duas horas à temperatura de 50°C (banho Maria) e complementada de 20 a 22 horas a 37°C.

Outro aspecto problemático residiu na escolha de um título aglutinante a ser considerado como ponto de referência para caracterizar os possíveis estados de infecção/doença. Optamos pelas observações realizadas na espécie humana, em que a maioria dos autores (WINBLAD, 1968; AIHVONEN & SIEVERS, 1969; WAUTERS, 1970), apontam o título de 1/80, como marco inicial para a positividade do diagnóstico sorológico.

3.4. Tratamento estatístico

Para o presente estudo são apresentadas tabelas,

nas quais foram aplicados os testes não paramétricos de χ^2 (Qui-quadrado) e de McNemar, para verificar a significância quanto aos resultados, adotando-se para tal o nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$), segundo PIMENTEL GOMES (1973) e SIEGEL (1975).

4. RESULTADOS

Os resultados lançados nas TAB. I, II e III mostram a frequência dos soros de bovinos jovens e adultos (não vacinados e vacinados contra brucelose) e suínos, reagentes ou não aos antígenos utilizados nas técnicas de soro-aglutinação rápida (SAR), soro-aglutinação lenta (SAL) e Card Test, para o diagnóstico sorológico da brucelose e de soro-aglutinação lenta, para *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9.

A análise dos elementos configurados na TAB. I permite estabelecer uma associação entre os resultados da SAR e do Card Test nos animais jovens (100% negativos), facto este não observado entre os adultos. Todavia, este grupo etário apresentou certa analogia nos resultados dos testes de SAL para *Brucella* sp e *Yersinia enterocolitica* 9 e o possível estado de infecção pelo sorotipo 3.

Quanto a este último sorotipo, verifica-se certa predominância de reagentes sobre o sorotipo 9 de *Yersinia enterocolitica* entre os jovens e adultos, sendo, porém, evidenciada nos animais jovens, embora a frequência deste acontecimento não seja elevada. Nota-se, também, que os jovens apresentaram uma porcentagem de reagentes aos sorotipos 3 e 9 de *Yersinia enterocolitica* mais elevada que aquela por *Brucella* sp. Já os adultos mostraram

diferenças somente nos resultados do teste de SAL, sendo detectadas porcentagens similares nos animais reagentes a *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica*, sorotipos 3 e 9, provavelmente em decorrência do fato de que a SAL evidencia melhor as interferências antigênicas entre os dois microrganismos.

Em relação à TAB. II, observa-se que nos bovinos jovens (vacinados) houve uma constância nos resultados dos testes de aglutinação para *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9, porém, deve-se ponderar o pequeno número de amostras em estudo como fato limitante de uma análise mais apurada dos resultados.

Nos animais adultos, os resultados foram semelhantes nos testes de SAL e Card Test para *Brucella* sp. e na aglutinação para *Yersinia enterocolitica*, sorotipos 3 e 9.

Nota-se, ainda, uma porcentagem de reagentes a *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9 mais elevada que aquela encontrada para *Brucella* sp., tanto nos animais jovens como nos adultos.

Analisando ainda a TAB. II, verifica-se que entre os bovinos adultos somente um animal foi positivo à SAR, enquanto quatro foram positivos nos testes de SAL e Card Test. Ao se confrontar o número de animais negativos aos três testes (SAR, SAL e Card Test), destaca-se que três dos quatro animais positivos à SAL e ao Card Test foram incluídos como negativos na leitura de SAR. Estes resultados podem ser equiparados aos da TAB. I, com relação à SAR e ao Card Test, onde se pode atribuir a causa provável dessa divergência à classe de imunoglobulina atuante.

Para a classe dos bovinos vacinados, foi observado que a SAL e Card Test apresentaram o mesmo grau de sensibilidade.

A TAB. III evidencia uma pequena porcentagem de animais reagentes à *Yersinia enterocolitica* 3. Quanto aos testes de SAR, Card Test e soro-aglutinação lenta para *Y. enterocolitica* sorotipo 9, caracterizam-se pela homogenei-

dade dos resultados. Estes aspectos denotam talvez as interferências antigênicas entre *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* 9. Convém assinalar que o maior número de animais reagentes a *Brucella* sp. foi detectado no processo de soro-aglutinação lenta.

As TAB. IV a XV retratam os resultados de análise dos animais reagentes nas provas de diagnóstico sorológico da brucelose e *Yersinia enterocolitica* 3 em confronto com o antígeno de *Yersinia enterocolitica* 9 para os quais foram utilizados os testes não paramétrico de Qui-quadrado e de Mc Nemar.

Nas diversas associações em que se fez a análise de comportamento das provas, verificou-se que os resultados (++) e (--), isto é, positivos e negativos a *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9 concomitantemente, foram mais frequentes que aquelas referentes a *Brucella* positivo/*Y. enterocolitica* 9 negativo (+-) e *Brucella* negativo/*Yersinia* positivo (-+). Todos estes aspectos salientados podem ser melhor apreciados nas TAB. VIII, IX e X.

Nas TAB. IV e VIII, referentes a bovinos não vacinados e vacinados, respectivamente, ficou evidenciado que há um predomínio de *Y. enterocolitica* 9 (+) e SAR (-) sobre *Y. enterocolitica* 9 (-) e SAR (+).

Quanto aos detalhes das TAB. VI e X, abordando a associação do Card Test/*Y. enterocolitica* 9, nos bovinos não vacinados e vacinados, os resultados favoreceram ao binômio *Yersinia enterocolitica* 9 (+) e Card Test (-) em relação a *Y. enterocolitica* 9 (-) e Card Test (+).

Na TAB. IX, referente aos soros de bovinos vacinados, em que se confrontou a SAL de *Brucella*/*Y. enterocolitica* 9, verificou-se que *Y. enterocolitica* 9 (+) e SAL (-) foi mais frequente numericamente do que *Y. enterocolitica* 9(-) e SAL (+).

Nestas associações, os testes não paramétrico de Qui-quadrado e de Mc Nemar acusaram uma diferença signifi-

cativa ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$). Neste caso, supõe-se uma predominância da infecção por *Yersinia enterocolitica* 9, embora se tenham demonstrado as interferências antigênicas entre *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9.

Quando se compararam nos suínos (TAB. XV), aqueles que se apresentaram *Y. enterocolitica* 3 (+) e *Y. enterocolitica* 9 (-) com *Y. enterocolitica* 3 (-) e *Y. enterocolitica* 9 (+), notou-se diferença significativa, que evidenciou nitidamente o predomínio de *Y. enterocolitica* 9. Aqui foram detectados animais reagentes somente a *Yersinia enterocolitica* 3, assim como animais que reagiram aos dois sorotipos, entretanto, com predomínio evidente dos reagentes a *Y. enterocolitica* 9.

Com relação às provas realizadas, catalogadas nas TAB. V, VII, XI, XII e XIV, os resultados apresentaram discordância quanto a positivos (+) e negativos (-) para os microrganismos em questão, não sendo observada, contudo, diferença significativa entre os perfis. Convém destacar que, nas TAB. V, XII e XIV, um número equivalente ou mesmo aproximado de animais reagiu somente para *Brucella* sp ou para *Y. enterocolitica* 9. O mesmo fenômeno foi detectado entre *Y. enterocolitica* sorotipos 3 e 9, como pode ser analisado nas TAB. VII e XI. Obviamente, nestas associações não houve prevalência de determinado agente sobre o outro.

Na TAB. XIII, onde se comparou o comportamento reacional dos soros de suínos nas associações de SAL (+) e *Y. enterocolitica* 9 (-) em relação a SAL (-) e *Yersinia enterocolitica* 9 (+), obteve-se uma diferença significativa, com destaque para *Brucella* sp., não sendo reconhecido nenhum reagente a *Y. enterocolitica* 9 isoladamente.

Convém salientar que, em todas as associações dos testes de *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9 confrontados, ficou patente o relacionamento antigênico entre os microrganismos.

Na TAB. XVI, procurou-se comparar o número de

bovinos não vacinados e vacinados contra a brucelose, reagentes a *Y. enterocolitica* 9, em cujos resultados não foi observada significância entre os dois grupos analisados. Este dado obtido permite concluir que não há atuação destacada para *Y. enterocolitica* 9 nesses espécimens.

Nos resultados lançados na TAB. XVII, em que se realizou a mesma abordagem anterior, mas incluindo-se os suínos, também não foi obtida nenhuma significância entre os grupos analisados, concluindo-se, do ponto de vista estatístico, que a sensibilização por *Y. enterocolitica* 9 não sofre nenhuma influência ao nível de espécie animal, nem, tampouco, do grau de imunização contra a brucelose.

Finalmente, na apresentação da TAB. XVIII, fez-se uma computação de todos os dados analisados, incluindo-se as amostras colhidas e escrutinadas por espécie e processos laboratoriais utilizados. Isto permitiu a obtenção de múltiplos perfis reacionais e suas respectivas frequências, de acordo com o comportamento individual das amostras em cada um dos testes efetuados.

Em princípio, com base analítica, enfatiza-se o grande número dos soros que se revelaram negativos aos quatro testes executados, atingindo a 64,56%. Em nível bastante inferior, salienta-se o perfil de positividade revelado nos quatro processos, no qual os suínos apresentaram um percentual bem mais acentuado do que aqueles referentes aos bovinos. Entretanto, quando se compara este dado apresentado para os suínos com aqueles catalogados no 4º perfil verifica-se que nenhum soro desta espécie apresentou reação positiva individual a *Y. enterocolitica* 9. A positividade a este antígeno só ocorreru concomitantemente com a de *Brucella* sp., como pode ser observado no 2º, 5º, 6º e 13º perfis.

No cômputo geral, considerando apenas os 129 soros que reagiram com qualquer um dos antígenos empregados, verificar-se-á que 60 demonstraram reações cruzadas entre

Brucella sp. e *Y. enterocolitica* sorotipo 9. Em segundo plano, salienta-se que 46 soros apresentaram reações positivas com um dos antígenos de *Brucella* sp. e 23 outros revelaram especificidade para *Yersinia enterocolitica* 9.

Analisando, ainda, no terreno dos soros positivos a um dos antígenos utilizados, e qualificando-se estes resultados segundo a característica de espécie, nota-se que no caso das reações cruzadas houve predominância entre os suínos, como, aliás, foi destacado anteriormente, e, dentre os métodos que evidenciaram este problema de forma mais pronunciada, destaca-se a técnica de soro-aglutinação lenta.

TABELA I - Frequência de soros de bovinos não vacinados (jovens e adultos) reagentes ou não, aos antígenos de *Brucella abortus* e de *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

Classe	Resultados	Jovens				Adultos			
		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
Técnicas		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
SAR		-	-	23	100	10	6,17	152	93,82
SAL		4	17,39	19	82,60	34	20,98	128	79,01
Card Test		-	-	23	100	20	12,34	142	87,65
Y. e. 3		8	34,78	15	65,21	33	20,37	129	79,62
Y. e. 9		6	26,08	17	73,91	32	19,75	130	80,24

(3) Os títulos ao nível de suspeito foram incluídos como negativos

TABELA II - Frequência dos soros de bovinos vacinados (jovens e adultos) reagentes ou não aos antígenos de *Brucella abortus* e de *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

Classe	Jovens				Adultos					
	Resultados		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
Técnicas	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
SAR	-	-	9	100	1	1,96	50	98,03		
SAL	-	-	9	100	4	7,84	47	92,15		
Card Test	-	-	9	100	4	7,84	47	92,15		
Y. e. 3	1	11,11	8	88,88	12	23,52	39	76,47		
Y. e. 9	1	11,11	8	88,88	12	23,52	39	76,47		

TABELA IV - Comportamento dos soros de bovinos não vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAR)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
SAR	+	3 (1,62%)	7 (3,78%)	10 (5,4%)
	-	144 (77,83%)	31 (16,75%)	175(94,59%)
TOTAL		147 (79,45%)	38 (20,54%)	185(99,99%)
$\chi^2 = 23,05$				

TABELA V - Comportamento dos soros de bovinos não vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAL)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
SAL	+	17 (9,18%)	21 (11,35%)	38 (20,54%)
	-	130 (70,27%)	17 (9,18%)	147 (79,45%)
TOTAL		147 (79,45%)	38 (20,54%)	185 (99,99%)

$\chi^2 = 0^{n.s.}$

TABELA VI - Comportamento dos soros de bovinos não vacinados contra a brucelose reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (Card Test)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
Card Test	+	2 (1,08%)	18 (9,72%)	21 (11,35%)
	-	145(78,37%)	20 (10,81%)	164 (88,64%)
TOTAL		147(79,45%)	38 (20,54%)	185 (99,99%)

$$\chi^2 = 14,08$$

TABELA VII - Comportamento dos soros de bovinos não vacinados contra a brucelose reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
<i>Y. e. 3</i>	+	26 (14,05%)	15 (8,10%)	41 (22,16%)
	-	121 (65,40%)	23 (12,4%)	144 (77,83%)
TOTAL		147 (79,40%)	38 (20,54%)	185 (99,99%)

$X = 0,18^{n.s.}$

TABELA VIII - Comportamento dos soros de bovinos vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAR)

Técnica	Reação	Antígeno Y. e. 9		Total
		-	+	
SAR	+	-	1 (1,66%)	1 (1,66%)
	-	47(78,33%)	12 (20,0%)	59 (98,33%)
TOTAL		47(78,33%)	13 (21,66%)	60 (99,99%)

$$\chi^2 = 12$$

TABELA IX - Comportamento dos soros de bovinos vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAL)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
SAL	+	-	4 (6,66%)	4 (6,66%)
	-	47 (78,33%)	9 (15,0%)	56 (93,33%)
TOTAL		47 (78,33%)	13 (21,66%)	60 (99,99%)

$$\chi^2 = 9$$

TABELA X - Comportamento dos soros de bovinos vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (Card Test)

Técnica	Reação	Antígeno Y. e. 9		Total
		-	+	
Card Test	+	-	4 (6,66%)	4 (6,66%)
	-	47 (78,33%)	9 (15,0%)	56(93,33%)
TOTAL		47 (78,33%)	13 (21,66%)	60(99,99%)

$$\chi^2 = 9$$

TABELA XI - Comportamento dos soros de bovinos vacinados contra a brucelose, reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorótipos 3 e 9

Técnica	Reação	Antígeno Y. e. 9		Total
		-	+	
Y. e. 3	+	6 (10,0%)	7 (11,66%)	13 (21,66%)
	-	41 (68,33%)	6 (10,0%)	47 (78,33%)
TOTAL		47 (78,33%)	13 (21,66%)	60 (99,99%)

$$\chi^2 = 0^{n.s.}$$

TABELA XII - Comportamento dos soros de suínos reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAR)

Técnica	Reação	Antígeno Y. e. 9		Total
		-	+	
SAR	+	10 (8,40%)	25 (21,0%)	35 (29,41%)
	-	77 (64,70%)	7 (5,88%)	84 (70,58%)
TOTAL		87 (73,10%)	32(26,89%)	119 (99,99%)

$\chi^2 = 0,53^{n.s.}$

TABELA XIII - Comportamento dos soros de suínos reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (SAL)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
SAL	+	27 (22,68%)	32 (26,89%)	59 (49,57%)
	-	60 (50,42%)	-	60 (50,42%)
TOTAL		87 (73,1%)	32 (26,89%)	119 (99,99%)

$\chi^2 = 27,0$

TABELA XIV - Comportamento dos soros de suínos reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e de *Brucella abortus* (Card Test)

Técnica	Reação	Antígeno <i>Y. e. 9</i>		Total
		-	+	
Card Test	+	5 (4,2%)	25 (21,0%)	30 (25,21%)
	-	82 (68,90%)	7 (5,88%)	89 (74,78%)
TOTAL		87 (73,10%)	32 (26,89%)	119 (99,99%)

$$\chi^2 = 0,33^{n.s.}$$

TABELA XV - Comportamento dos soros de suínos reagentes aos antígenos de *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9

Técnica	Reação	Antígeno Y. e. 9		Total
Y. e. 3	+	8 (6,72%)	2 (1,68%)	10 (8,40%)
	-	79 (66,38%)	30 (25,21%)	109 (91,59%)
TOTAL		87 (73,10%)	32 (26,89%)	119 (99,99%)

$$\chi^2 = 12,7$$

TABELA XVI - Comportamento dos soros de bovinos não vacinados e vacinados contra a brucelose, reagentes ao sorotipo 9 de *Yersinia enterocolitica*

Reação/Classe	Antígeno Y. e. 9		Total
	+	-	
Não vacinados	38 (39)	147 (146)	185
Vacinados	13 (12)	47 (48)	60
TOTAL	51	194	245

$$\chi^2 = 0,13^{n.s.}$$

TABELA XVII - Frequência de bovinos e suínos reagentes ao sorotipo 9 de *Yersinia enterocolitica*

Reação/Espécie	Antígeno Y. e. 9		Total
	+	-	
Bovinos	51 (56)	194 (189)	245
Suínos	32 (27)	87 (92)	119
TOTAL	83	281	364

$$\chi^2 = 1,76^{\text{n.s.}}$$

TABELA XVIII - Distribuição e frequência dos perfis reacionais de soros de bovinos (não vacinados e vacinados contra a brucelose) e suínos em presença dos antígenos de *Bruceella* sp. (SAR, SAL e Card Test) e de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9

SAR	Técnicas			Espécies animais						Total	
	SAL	Card Test	SAL v. e. 9	Bovinos não vacinados		Bovinos vacinados		Suínos			
				Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº
-	-	-	-	128	69,18	47	78,33	60	50,42	235	64,56
+	+	+	+	7	3,78	1	1,66	24	20,16	32	8,79
-	+	-	-	15	8,10	-	-	10	13,44	31	8,51
-	-	-	+	15	8,10	8	13,3	-	-	23	6,31
-	+	+	+	9	4,86	2	3,33	1	0,8	12	3,29
-	+	-	+	5	2,70	1	1,66	6	5,04	12	3,29
+	+	-	-	1	0,54	-	-	6	5,04	7	1,92
-	-	+	+	2	1,08	1	1,7	-	-	3	0,82
+	-	-	-	1	0,54	-	-	-	-	1	0,27
-	-	+	-	1	0,54	-	-	-	-	1	0,27
-	+	+	-	-	-	-	-	1	0,84	1	0,27
+	+	+	-	1	0,54	-	-	4	3,36	5	1,37
+	+	-	+	-	-	-	-	1	0,84	1	0,27
TOTAL				185	99,96	60	99,98	119	99,94	364	99,94

5. DISCUSSÃO

Desde a observação inicial realizada por AHVONEN (1968) numerosas pesquisas foram encetadas com a finalidade de analisar os diferentes fatores envolvidos nas estreitas relações antigênicas entre o sorotipo 9 de *Yersinia enterocolitica* e membros do gênero *Brucella*. Para tanto, os vários autores recorreram às mais diferentes técnicas imunológicas e realizaram suas investigações baseando-se quase que essencialmente no comportamento reacional de animais inoculados em caráter experimental, raramente perscrutando ou extrapolando o problema no sentido da aplicação em campo, isto é, em condições naturais.

Por outro lado, muitos pesquisadores se empenharam em caracterizar a(s) fração(ões) antigênicas responsáveis pelas reações sorológicas cruzadas, assim como a natureza dos anticorpos produzidos em resposta aos antígenos totais ou fracionados de *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9. Lançaram mão, para tais observações, de técnicas mais apuradas ou sofisticadas, como a de imunodifusão, imunoeletroforese, fixação de complemento, antiglobulina de Coombs, imunofluorescência e os testes de absorção cruzada que, excepcionalmente, são utilizados na rotina do diagnóstico sorológico da brucelose (DIAZ & DORRONSORO, 1971; FRIBOURG-

BLANC, 1970; HUVELL, 1972; CORBEL, 1973; MARX et alii, 1975).

Os resultados obtidos nas amostras séricas de bovinos jovens não vacinados demonstraram que somente o teste de SAL revelou a presença de um discreto número de reagentes à *Brucella* sp., quando confrontados com a porcentagem mais elevada para os sorotipos 3 e 9 de *Yersinia enterocolitica*.

Embora se tenha trabalhado com pequena amostra de material desta origem, é possível admitir que estes animais tenham sido sensibilizados pelos sorotipos de *Yersinia enterocolitica*. Este acontecimento deve ser a causa de detecção de reagentes à *Brucella* sp., na SAL, considerando as interferências antigênicas existentes entre *Y. enterocolitica* sorotipo 9 com este microrganismo.

Em relação aos soros de bovinos jovens vacinados, paradoxalmente, nenhum deles reagiu positivamente a *Brucella* sp. em qualquer dos testes efetuados. Destaca-se que apenas em um dos animais se observou reação para as yersinias. Da mesma forma, deve-se ponderar, sobre a análise dos resultados obtidos, a influência exercida pela insignificância da amostra assim como pelo fato de que a imunização contra brucelose possa ter sido realizada com produto imunoterápico inadequado. Salienta-se este último aspecto com respaldo nas observações de ARAUJO (1976), que demonstrou a existência de vacina anti-*Brucella* que não apresenta os requisitos mínimos preconizados para a imunização.

Quanto à participação concomitante da sensibilização pelos sorotipos de *Yersinia enterocolitica*, pode-se alegar o fenômeno das reações cruzadas, como foi observado por HURVELL et alii (1976).

Com relação aos bovinos adultos (vacinados e não vacinados), verificou-se que todos os testes para *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* 3 e 9 detectaram reações a nível de positivo. Outro aspecto a ser ressaltado é que os

adultos não vacinados apresentaram porcentagem de reagentes a *Yersinia enterocolitica* 3 e 9 menor que os jovens, sendo observado o contrário em relação aos adultos vacinados.

Salienta-se, também, que nos adultos (não vacinados e vacinados) o Card Test sempre apresentou maior número de reagentes que a SAR. Isto pode ser explicado pela redução dos títulos na SAR, com a inclusão dos animais suspeitos (títulos de 1/50 e 1/100, respectivamente) no grupo de animais negativos; quando estes mesmos animais foram analisados pelo teste de Rosa Bengala (Card Test), reagiram positivamente, em decorrência da classe de imunoglobulina envolvida. Convém, ainda, assinalar a homogeneidade dos resultados dos testes de SAL e Card Test, onde quatro animais vacinados reagiram positivamente, ao passo que somente um reagiu à SAR. Pode-se atribuir a causa desta divergência à classe de imunoglobulina atuante ou, em consequência, à fase da infecção. Verifica-se, ainda, que os animais vacinados apresentaram baixa taxa de reagentes à *Brucella* sp. e uma porcentagem mais alta de animais sensibilizados à *Y. enterocolitica* 9. Neste caso, não se poderá afirmar que esses animais sofreram sensibilização somente por *Yersinia enterocolitica* 9, visto que aqueles que apresentaram títulos de 1/200 parcial no teste de SAR e 1/160 parcial na SAL são considerados suspeitos no critério de interpretação para animais vacinados e que, no presente estudo, alguns títulos foram incluídos na classe dos negativos.

Por outro lado, é admissível suspeitar que esses animais, uma vez imunizados contra *Brucella abortus*, tenham sofrido sensibilização posterior por *Y. enterocolitica* 9, originando as reações positivas para *Brucella* sp, em virtude do relacionamento antigênico.

Curiosamente, ao serem analisados individualmente os 60 soros de bovinos vacinados, pode-se observar que, dentre os positivos à *Y. enterocolitica* 9 com título 1/80, um

animal foi positivo ao Card Test e, no entanto, revelou títulos muito baixos na SAR e SAL (1/25 e 1/40, respectivamente). Provavelmente, este animal sofreu alguma forma de sensibilização por *Yersinia enterocolitica* 9, cujos anticorpos foram detectados pelo Card Test.

Ainda com relação aos bovinos vacinados que reagiram ao Card Test, somente três foram positivos à SAL enquanto que um bovino positivo na SAL (1/160), foi negativo ao Card Test.

Os bovinos vacinados apresentaram uma porcentagem idêntica de reagentes aos sorotipos 3 e 9 de *Yersinia enterocolitica*, porém, nos não vacinados, o sorotipo 3 foi predominante, principalmente nos jovens.

No que diz respeito aos suínos, observou-se que a SAL foi o teste que detectou maior número de animais reagentes à *Brucella* sp., denotando maior sensibilidade do teste, aliás, de maneira similar àquela anotada em relação aos bovinos.

Verifica-se que os testes de SAR, Card Test e aglutinação para *Y. enterocolitica* 9 apresentaram resultados quase idênticos, possibilitando a dedução de que a SAR e o Card Test acentuam mais nitidamente as interferências antigênicas de *Brucella* sp. com a *Y. enterocolitica* 9.

Em seqüência ao estudo longitudinal do problema, procurou-se agrupar as amostras segundo a espécie e o estado de imunização contra a brucelose, tendo-se sempre o cuidado de confrontar os resultados obtidos nos testes para *Brucella* sp. com aqueles verificados para *Yersinia enterocolitica* 3 e 9.

5.1. Relação soro-aglutinação rápida com *Yersinia enterocolitica* 9

5.1.1. Bovinos não vacinados

Observa-se que dos 185 animais examinados, 144

espécimens foram negativos à SAR e *Yersinia enterocolitica* 9 (TAB. IV). Curiosamente, nos 41 animais reagentes, 31 mostraram, em caráter exclusivo, a sensibilização por *Y. enterocolitica* 9, não evidenciado o fenômeno de reação cruzada com o antígeno de *Brucella* sp. Para explicação desse acontecimento, poder-se-á evocar, como causa, a negativação dos títulos efetuados nos animais com reações suspeitas, na SAR.

5.1.2. Bovinos vacinados

Nos 13 animais que reagiram à *Y. enterocolitica* 9 (TAB. VIII), somente um revelou positividade à *Brucella* sp. É possível admitir que esses 12 animais restantes tenham tido alguma reação no processo de soro-aglutinação rápida, mas em títulos abaixo daqueles considerados como positivos na presente investigação. Paradoxalmente, apenas um animal se positivou nos dois testes, demonstrando um relacionamento antigênico entre os microrganismos, ou talvez que tenha sido sensibilizado de forma concomitante por *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9.

5.1.3. Suínos

Com relação aos suínos (TAB. XII), analisando-se os resultados dos 119 animais estudados, 25 caracterizaram-se como positivos, ao passo que um número relativamente pequeno reagiu a *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9 nos testes isolados, seja para um ou para outro microrganismo. Este aspecto ilustra com clareza o relacionamento antigênico entre as duas bactérias.

Analisando ainda o comportamento das espécies animais frente aos antígenos de *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* 9, pelo teste não paramétrico de Qui-quadrado, nota-se que para os bovinos (não vacinados e vacinados)

o resultado foi significativo, demonstrando que a SAR e a aglutinação para *Yersinia enterocolitica* 9 evidenciam melhor os animais infectados por *Brucella* sp., bem como as reações antigênicas cruzadas. Saliênta-se, entretanto, que houve predominância da infecção por *Y. enterocolitica* 9, tendo em vista o número bem maior de animais reagentes a esta bactéria e negativos a *Brucella* sp.

Quanto aos suínos, os dois testes não caracterizaram os animais reagentes a um ou outro microrganismo, considerando-se que a SAR e o teste de aglutinação para *Y. enterocolitica* 9 não diferenciam as duas infecções.

5.2. Relação soro-aglutinação lenta com *Yersinia enterocolitica* 9

5.2.1. Bovinos não vacinados

Os dados catalogados na TAB. V evidenciaram que 130 animais não apresentaram reação positiva nas soro-aglutinações lenta de *Brucella* sp. e *Y. enterocolitica* 9. Este resultado admite que, provavelmente, os 14 dos 144 animais negativos relacionados na TAB. IV foram positivos na SAL, e que os 14 dos 31 animais reagentes, anotados nesta mesma Tabela, foram incluídos nos 21 espécimens positivos aos dois testes como consta na TAB. V.

O teste de SAL torna mais palpável a figura do relacionamento antigênico entre *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* 9, pois aponta número idêntico de animais reagentes aos dos antígenos (17 amostras).

O único problema da interpretação imediata dos resultados apresentados refere-se aos 21 animais reagentes comuns, visto que, através dos processos empregados, torna-se impossível caracterizar a primo-infecção. Este fato foi analisado estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado, que revelou ausência de domínio de um determinado agente sobre o outro.

5.2.2. Bovinos vacinados

Salienta-se que 4 dos 13 animais que reagiram a *Yersinia enterocolitica* 9 apresentaram reação a *Brucella* sp. (TAB. IX), demonstrando o relacionamento antigênico dos dois microrganismos. Os resultados obtidos apontam que, nos animais vacinados, a prova de SAL caracteriza com maior nitidez as reações cruzadas com *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9, corroborada pela análise estatística.

5.2.3. Suínos

Observa-se pelos resultados apresentados na TAB. XIII, que os sete soros animais, que nas TAB. XII e XIV foram negativos para brucelose nas provas rápida e Card Test, se revelaram positivos quando analisados pela SAL, o que perfaz um total de 32 animais reagentes aos dois antígenos. Enfatiza-se também que 17 dos 77 animais negativos na soro-aglutinação rápida (TAB. XII) se revelaram positivos quando analisados pela SAL, totalizando 27 soros reagentes. Explica-se este acontecimento pela razão de títulos mais baixos serem considerados como positivos na prova de SAL, englobando, portanto, maior contingente de animais reagentes. Por outro lado, o teste de Qui-quadrado foi significativo para demonstrar que o método lento, além de evidenciar as interferências antigênicas entre *Brucella* sp. e *Yersinia enterocolitica* 9, mostrou o predomínio da infecção por *Brucella* sp nos suínos, uma vez que nenhum animal reagiu apenas com *Yersinia enterocolitica* 9.

Do exposto, infere-se que, para os bovinos não vacinados, a associação da SAL para brucelose com o teste de aglutinação para *Y. enterocolitica* 9 é incapaz de caracterizar os animais infectados por *Brucella* sp ou por *Y. enterocolitica* 9. Apesar de demonstrar as interferências antigênicas entre os dois microrganismos, ficou patente a

possibilidade de maior comprometimento por *Y. enterocolitica* 9 nos bovinos vacinados, enquanto que, nos suínos, predominou a infecção por *Brucella* sp.

5.3. Relação Card Test com *Y. enterocolitica* 9

5.3.1. Bovinos não vacinados

Nos elementos apresentados na TAB. VI observa-se que 20 animais estavam sensibilizados somente ao antígeno de *Y. enterocolitica* sorotipo 9 e que outros 18 animais reagiram de forma cruzada nos dois testes (Card Test e soro-aglutinação para *Y. enterocolitica* 9).

Pelo Card Test destacaram-se 20 animais sensibilizados ao antígeno de *Brucella* sp, ao passo que 38 animais reagiram ao antígeno de *Y. enterocolitica* 9. Salienta-se que o Card Test não é, provavelmente, capaz de diferenciar os animais sensibilizados imunologicamente por um ou ambos os microrganismos, haja visto o exemplo dos 18 animais reagentes aos dois testes. A título precário, pode-se admitir que esta amostra tenha sofrido, concomitantemente, a sensibilização pelos dois agentes, pois, como contraprova, verifica-se que 20 animais revelaram positividade somente a *Y. enterocolitica* 9. Para a explicação deste fenômeno deve-se considerar, também, a fase evolutiva ou grau de infecção nesses animais, assim como a classe e o nível de imunoglobulina presentes, pois, segundo MORGAN (1971) e LEVIEUX (1974), as imunoglobulinas IGg apresentam um papel importante para revelar as reações na prova de Rosa Bengala.

A associação dos dois métodos (Card Test e aglutinação para *Y. enterocolitica* 9) revelou, na análise pelo teste do Qui-quadrado, predominância da infecção por *Y. enterocolitica* 9 embora tenha evidenciado com clareza a interferência antigênica de *Brucella* sp. Em outras palavras, poder-se-á afirmar que a utilização simultânea dessas duas provas não permite caracterizar especificamente a atuação de um dos agentes etiológicos.

5.3.2. Bovinos vacinados

Os resultados reunidos na TAB. X podem ser equiparados aos da TAB. IX. Assim sendo, observa-se, como na SAL, que o Card Test revela, também, as interferências antigênicas entre *Brucella* sp e *Yersinia enterocolitica* 9 e que quando associada a aglutinação para *Y. enterocolitica* 9 exalta o predomínio da infecção por *Y. enterocolitica* 9.

A maior frequência de animais reagentes à SAL, ao Card Test e *Y. enterocolitica* 9 com relação à SAR, nos bovinos vacinados, deve-se, provavelmente, ao fato de que a SAL engloba maior número de soros de animais reagentes por apresentar títulos mais baixos que os da SAR caracterizados como positivos, e que o Card Test é um método qualitativo dependendo, unicamente, do tipo de imunoglobulina presente.

Deve-se levar em consideração, neste caso, a fase evolutiva da infecção e/ou doença, pois foi verificado por MORGAN et alii (1969) que o teste de SAL tem limitações nas fases de incubação e crônica da doença, assim como na diferenciação de anticorpos resultantes da infecção e da vacinação. NICOLETTI (1967), MORGAN et alii (1969) e PILET et alii (1972), acentuam que o Card Test é capaz de reconhecer os animais reagentes antes de serem detectados pela SAL.

Outro fato que se deve ponderar é que os animais vacinados apresentam aglutininas oriundas da vacina. No presente trabalho, a interpretação dos animais vacinados foi feita pelo critério oficial de classificação dada para os testes de SAR e SAL. Quanto ao Card Test, foi verificado por NICOLETTI (1967), MORGAN (1969) e PILET et alii (1972); que este não permite diferenciar os animais imunizados com vacina aglutinogênica dos animais infectados. Salienta-se também que, no presente trabalho, nenhum animal vacinado e com menos de 36 meses de idade apresentou reação positiva aos três testes para brucelose, enquanto que os bovinos a-

dultos (acima de 6 anos) já apresentavam positividade à SAR, SAL e Card Test. É possível que esses animais tenham reagido, não devido a aglutininas induzidas pela vacina, mas pelas aglutininas originadas da infecção posterior por *Brucella* sp ou por indução do antígeno comum de *Yersinia enterocolitica* 9.

Neste grupo de animais parece que há predominância da infecção por *Y. enterocolitica* 9, fato este destacado pelas porcentagens de positividade à *Y. enterocolitica* 9 constantes nas TAB. II, VIII, IX, X e XVIII e confirmado pelo tratamento estatístico do teste de Qui-quadrado.

Cumprе lembrar que, em virtude do relacionamento antigênico entre *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9, animais vacinados, negativos aos testes para *Brucella* (dentro dos critérios de interpretação de animais vacinados), mas apresentando títulos muito próximos da positividade, poderiam ofertar reações positivas a *Y. enterocolitica* 9, uma vez que a interpretação deste teste foi a mesma que a dos animais não vacinados. Como exemplo, cita-se o caso de um animal que apresentou título de 1/80 na SAL, considerado negativo, mas que reagiu com o mesmo título para *Y. enterocolitica* 9, sendo nesta condição enquadrado como positivo. Este animal poderia ter reagido à *Y. enterocolitica* 9 simplesmente em decorrência da antigenicidade cruzada entre os dois microrganismos, e não por ter sofrido infecção por *Yersinia* sp.

5.3.3. Suínos

A análise dos resultados apresentados na TAB. XIV, em que foi estabelecido confronto entre os dados do Card Test com os da soro-aglutinação para *Y. enterocolitica* 9 demonstrou os mesmos resultados numéricos em soros reagentes a *Y. enterocolitica* 9, de forma similar aqueles apontados na TAB. XII. Quanto à SAR, esta apontou cinco soros positivos a mais que o Card Test e esta alteração de

resultado decorre, possivelmente, da classe de imunoglobulinas presentes. Este aspecto ilustra com clareza o relacionamento antigênico entre *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9 nos testes executados, não sendo observado predomínio de infecção por um ou outro microrganismo.

Do que foi analisado quanto à relação Card Test/*Y. enterocolitica* 9, para os bovinos não vacinados e vacinados, estes dois métodos demonstraram predomínio da infecção por *Y. enterocolitica* 9, embora evidenciando o relacionamento antigênico das duas bactérias. Em contraposição, para os suínos, este processo não permite diferenciar laboratorialmente as duas infecções.

Pelos aspectos analisados para os suínos, pode-se concluir, a título precário, que os métodos de SAR e Card Test ofertaram um grau de maior especificidade que a SAL, muito embora em escala menos acentuada, ainda visualizassem a antigenicidade cruzada entre os microrganismos.

5.4. Relação *Y. enterocolitica* 3 com *Y. enterocolitica* 9

5.4.1. Bovinos não vacinados

Confrontando a frequência dos animais reagentes aos sorotipos 3 e 9 de *Y. enterocolitica* verifica-se que a porcentagem de respostas positivas determinadas pelos dois microrganismos foi relativamente baixa, sem predominância acentuada de um determinado sorotipo (TAB. VII). Outro fato possível de relato, refere-se aos 15 animais que reagiram aos dois sorotipos, levando a supor que estes estavam infectados pelos dois tipos, ou talvez por outros sorotipos que tenham alguma capacidade de interferência antigênica.

5.4.2. Bovinos vacinados

Os resultados podem ser analisados do mesmo modo que os dos bovinos não vacinados (TAB. VII). Observa-se

que 6 dos 47 animais negativos a *Yersinia enterocolitica* e *Brucella* sp, coligidos nas TAB. VIII, IX e X, reagiram a *Y. enterocolitica* 3, demonstrando um estado de infecção somente por este microrganismo.

5.4.3. Suínos

Comparando os resultados com os sorotipos 3 e 9 de *Y. enterocolitica* (TAB. XV), assinala-se uma sensibilização antigênica mais atuante por parte do sorotipo 9 do que pelo tipo 3, fato este não verificado entre os bovinos, nos quais a taxa reacional foi mais equilibrada. Deve-se ponderar que os dois animais que reagiram aos sorotipos 3 e 9 poderiam estar sensibilizados por ambos os tipos, ou por vários sorotipos da espécie *Y. enterocolitica*. Convém salientar que as reações positivas a *Y. enterocolitica* 9 poderiam ser exclusivamente oriundas da sensibilização por *Brucella* sp.

De modo geral, analisando as diversas relações entre testes sorológicos para *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* sorotipos 3 e 9 para os bovinos não vacinados observou-se que apesar de evidenciar antigenicidade cruzada em todos os testes, as relações SAR/*Y. enterocolitica* 9 e Card Test/*Y. enterocolitica* 9 possibilitaram discriminar maior número de animais infectados por *Y. enterocolitica* 9. Em contraposição, a relação SAL/*Y. enterocolitica* 9 caracterizou-se por demonstrar mais nitidamente as interferências antigênicas entre os dois microrganismos. Já a análise dos bovinos imunizados contra a brucelose, em todas as relações experimentadas (SAR/*Y. enterocolitica* 9; SAL/*Y. enterocolitica* 9 e Card Test/*Y. enterocolitica* 9), foi estatisticamente significativa para diferenciar a infecção por um ou outro microrganismo que, na amostra estudada, recaiu em *Y. enterocolitica* 9.

Nos suínos, embora exteriorizadas de modo mais sensível, as interferências antigênicas cruzadas entre

Brucella sp e *Y. enterocolitica* 9, somente a relação SAL/*Y. enterocolitica* 9 foi capaz de qualificar o agente etiológico envolvido. Nesta amostra a *Brucella* sp predominou, apesar de ter sido a relação que melhor caracterizou as reações cruzadas.

Confrontando, ainda, a possível sensibilização exercida pelos sorotipos 3 e 9 de *Y. enterocolitica*, verificou-se um grau de significância apenas para os suínos, o que permite concluir, do ponto de vista estatístico, que a intervenção pelo sorotipo 9 de *Y. enterocolitica* é mais prevalente. Entretanto, este aspecto salientado entra em desacordo com os resultados observados na TAB. XVIII, em que nenhum animal reagiu isoladamente a *Y. enterocolitica* 9, levando a supor que a predominância deste sorotipo, apresentada na TAB. XV se deve, principalmente, às interferências antigênicas por parte de *Brucella* sp.

Com relação ao teste de aglutinação para *Y. enterocolitica* 3, destaca-se, em primeiro plano, que este tipo contribuiu como testemunha numa tentativa de demonstrar o não relacionamento antigênico deste sorotipo com *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9. Todavia, isto não afasta a possibilidade de que vários animais se tenham infectado por *Y. enterocolitica* 3, ou por um outro sorotipo de *Y. enterocolitica*.

Na execução da prova de aglutinação para *Y. enterocolitica* 3 nos animais em estudo, alguns reagiram em altos títulos; portanto, sorologicamente, poderiam ser considerados em estado de infecção e/ou doença.

Convém salientar que na investigação realizada, a prevalência da infecção por este sorotipo nos bovinos e suínos foi baixa. Este aspecto se coaduna com os dados da literatura consultada em relação à participação de *Yersinia enterocolitica* 3 em bovinos. Em contraposição, vários pesquisadores que estudaram a ocorrência de sorotipos de *Y. enterocolitica* em diversas espécies animais, caracterizaram o suíno como o animal doméstico mais atingido pelo so-

rotipo 3 (WINBLAD, 1973; AHVONEN et alii, 1973; ESSEVELD & GOUDZWAARD (1973); NILEHN, 1973; VANDEPITTE et alii, 1973; PEDERSEN, 1976).

Já com relação a *Y. enterocolitica* 9, não foi encontrada na literatura consultada nenhum registro da ocorrência deste sorotipo nos bovinos, embora outros sorotipos ocorram nesta espécie animal. Os únicos trabalhos que abordam a infecção dos bovinos por este sorotipo referem-se às inoculações experimentais realizadas por CORBEL & CULLEN (1970) e CORBEL (1973).

No cômputo geral, observa-se que dos 364 soros analisados, 129 (35,43%) apresentaram reação a um dos antígenos utilizados, sendo que 46 (12,63%) reagiram a *Brucella* sp, 23 (6,31%) a *Y. enterocolitica* 9 e 60 (16,48%) apresentaram reações cruzadas.

Dentre os animais que apresentaram maior índice de sensibilização por *Brucella* sp destacam-se os suínos (22,68%), seguidos dos bovinos não vacinados (10,27%). Nos bovinos vacinados não foi observada nenhuma reação a qualquer dos testes para *Brucella* sp a não ser quando em combinação com *Y. enterocolitica* 9. É claro que foram anotadas reações a baixos títulos, não alcançando, porém, a positividade. Estas reações seriam, provavelmente, oriundas da vacinação.

Quanto à resposta somente ao antígeno de *Y. enterocolitica* 9, os bovinos vacinados foram os que se mostraram mais sensibilizados (13,33%) seguidos dos não vacinados (8,10%), ao passo que os suínos não reagiram isoladamente, apresentando aglutininas somente nas combinações com testes para *Brucella* sp. A explicação para este fenômeno se faz racionalmente, incriminando as reações antigênicas cruzadas deste sorotipo com membros do gênero *Brucella*.

Evidentemente, com os recursos técnicos utilizados no trabalho, podem ser apontadas certas reações como mais compatíveis para o diagnóstico sorológico de brucelose nos hospedeiros. Isto, precariamente, leva também à su-

posição de que os suínos não se constituem na principal fonte de infecção de *Y. enterocolitica* 9, no ciclo epidemiológico.

Analisando o comportamento individual dos 364 soros dos animais em estudo, verifica-se que dos 185 bovinos não vacinados, 11 animais reagiram (qualquer título) somente a *Y. enterocolitica* 9, não apresentando título para *Brucella* sp. O mesmo fato pode ser abordado em relação aos bovinos vacinados, em que 16 de 60 animais reagiram a *Y. enterocolitica* 9, e aos suínos, com 5 entre 119, que revelaram títulos para *Y. enterocolitica* 9, inclusive alguns não alcançando a positividade, porém, denotando sensibilização por *Y. enterocolitica* 9.

Outro detalhe interessante refere-se ao fato de que 45 de 185 bovinos não vacinados, 7 de 60 bovinos vacinados e 5 de 119 suínos apresentaram títulos para *Brucella* sp, alguns ao nível de positivo, sem apresentar qualquer título para *Y. enterocolitica* 9. Isto demonstra que esses animais foram sensibilizados apenas por *Brucella* sp sem as evidências com relacionamento antigênico entre os dois microrganismos. Admite-se que, dependendo da fase de infecção por *Brucella* sp, as aglutininas reagentes cruzadas não são detectadas. Este aspecto se sedimenta no trabalho de CORBEL (1973), que assinalou que, no soro de bovinos inoculados com *Y. enterocolitica* 9, os anticorpos reagentes cruzados são semelhantes qualitativamente aos de *Brucella* sp, porém, se diferenciam em ordem cronológica, sofrendo um rápido declínio.

Observa-se que vários animais, que reagiram com títulos altos para *Brucella* sp a nível de positivos, apresentaram títulos idênticos ou mais altos para *Y. enterocolitica* 9. Estes resultados vão de encontro aos achados de AHVONEN et alii (1969b) que, analisando soros humanos, encontraram situação idêntica. Da mesma forma, nos resultados de CORBEL & CULLEN (1970), que utilizaram soros bovinos inoculados com *Y. enterocolitica* 9 e *Brucella abortus* (independendo de com

qual dos dois microrganismos os animais haviam sido inoculados), os títulos de aglutininas para *Y. enterocolitica* 9 foram sempre iguais ou mais altos que os apresentados para *Brucella abortus*. Estas reações foram também verificadas quando os autores estudaram um grande número de bovinos submetidos ao esquema de brucelose (Accredited Herds) e asinalaram que os poucos animais que reagiram negativamente a *Brucella* sp, aglutinaram em presença de *Y. enterocolitica* 9.

Com o intuito de demonstrar a interferência antigênica entre os dois microrganismos, na presente investigação foi analisado o comportamento reacional de soros de coelhos hiperimunes para *Y. enterocolitica* sorotipos 3 e 9, diante dos antígenos homólogos e frente aos antígenos de *Brucella* sp. Não se observou nenhuma reação de vulto com o soro anti-*Y. enterocolitica* 3, ao passo que o soro *Y. enterocolitica* 9 apresentou reação parcial no título 1/25 no teste de SAR e 1/80 na SAL, e discreta aglutinação no Card Test.

Com base nestes resultados, é possível admitir que, em condições naturais, os animais infectados por *Y. enterocolitica* 9 poderão reagir, ou não, com *Brucella* sp dependendo, acima de tudo, da fase de infecção. Admite-se, ainda, que estas provas sorológicas empregadas rotineiramente no diagnóstico da infecção brucélica são incapazes de diferenciar a resposta imunológica dos hospedeiros aos dois microrganismos.

Aliás, CORBEL & CULLEN (1970) conceituaram que a resposta imunológica a *Y. enterocolitica* 9 não pode ser diferenciada daquela para *Brucella* sp com base nos testes de soro-aglutinação. Verificaram que bovinos e coelhos imunizados com *Brucella abortus* ou *Y. enterocolitica* 9 apresentaram reações positivas no teste de Rosa Bengala, em placa. Em recíproca, quando utilizaram suspensões de *Y. enterocolitica* 9 coradas pelo Rosa Bengala (RBYe), obtiveram também reações positivas para os dois microrganismos. Acentuaram que a utilização de um teste quantitativo em

placa, através de diluições seriadas do soro, usando suspensões de *Y. enterocolitica* 9 e *Brucella abortus* coradas pelo Rosa Bengala, foi capaz de especificar a atuação imunológica das duas bactérias. Os resultados obtidos revelaram que bovinos infectados por *Brucella* sp ofertaram títulos aglutinantes tanto nos antígenos de *Yersinia*-Rosa Bengala como no seu homólogo de *Brucella* sp, no mesmo nível ou discretamente, mais elevados para *Brucella*. Por outro lado, bovinos inoculados com *Y. enterocolitica* 9 apresentaram títulos de aglutininas invariavelmente mais altos para *Y. enterocolitica* 9.

Convém salientar que no presente trabalho, no decorrer da execução das provas sorológicas, foram anotados alguns soros que apresentaram reações com baixos títulos na SAR, ou positivos para *Brucella* sp na SAL e também para *Y. enterocolitica* 9, que evidenciaram uma aglutinação discreta (grumos finos) no Card Test, semelhante àquela relatada para o soro de coelho hiperimune anti-*Y. enterocolitica* 9. É provável, ao se analisar o fenômeno, que tais animais estivessem infectados por *Y. enterocolitica* ou que, talvez, a fase de infecção, tanto por *Brucella* sp como por *Y. enterocolitica* 9, tenha exercido uma influência qualitativa e/ou quantitativa na imunoglobulina.

Como se pode verificar, a resposta imunológica ao antígeno reagente cruzado de *Y. enterocolitica* 9 foi evidenciada e considerada significativa em relação aos seus possíveis efeitos para a interpretação dos testes sorológicos para brucelose.

A pesquisa efetuada mostrou a atividade dos anticorpos aglutinantes anti-brucélicos e anti-*Y. enterocolitica* 9 com títulos aproximados ou mesmo similares, do ponto de vista quantitativo. Desta forma, com base somente nos testes sorológicos empregados, não foi possível determinar com precisão, na maioria dos casos, o agente etiológico envolvido.

Para CORBEL (1973), embora pudesse estimular a

produção de altos títulos de aglutininas para *B. abortus*, a *Y. enterocolitica* 9 foi relativamente menos efetiva na indução de anticorpos precipitantes e fixadores do complemento. Salienta, ainda, que os anticorpos reagentes cruzados de *Y. enterocolitica* 9 foram transitórios e rapidamente declinaram a níveis insignificantes, não levando o animal a tornar-se um reator persistente nos testes diagnósticos para brucelose. Segundo o autor, este fato não acarretaria dificuldades na avaliação de bovinos livres de brucelose quando se utiliza um sistema de testes repetidos.

Como na presente investigação não foram realizados exames pareados, pode-se supor que alguns animais que reagiram positivamente, com títulos elevados para *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9, poderiam estar infectados somente por esta última bactéria, considerando o desenvolvimento cronológico dos anticorpos em resposta aos antígenos de *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9, como foi observado no trabalho de CORBEL (1973).

Ainda CORBEL (1973) verificou que a natureza dos anticorpos reagentes cruzados produzidos por *Y. enterocolitica* 9, não foi diferente qualitativamente daqueles induzidos por *B. abortus*, sendo detectados anticorpos das classes IgM, IgG₁, IgG₂ e, provavelmente, IgA.

Convém destacar que os resultados obtidos nos testes sorológicos para *Brucella* sp dependem da fase evolutiva da doença e do grau de contacto com o agente causal.

A análise das classes de anticorpos séricos de *Brucella* sp no homem revelou que a presença de IgG está associada com o estágio ativo do processo infeccioso, exteriorizando-se clinicamente por formas graves (ČERNYSEVA et alii, 1977).

LEVIEUX (1974), assinalou que a prova de soroprecipitação lenta detecta imunoglobulinas dos tipos IgM e IgG₂, ao passo que os testes de Rosa Bengala em placa e fixação de complemento caracterizam os anticorpos IgG₁, fato também descrito por CORBEL (1972).

MORGAN (1967) verificou que bezerras vacinadas com amostra B-19 produziram aglutininas das classes IgM e IgG. As IgM desenvolvem-se antes das IgG, surgindo entre 5 a 7 dias após vacinação, atingindo o ápice no período de 13 a 21 dias. As imunoglobulinas do tipo G foram detectadas 14 a 21 dias após a vacinação, situando-se sua máxima concentração em 28 a 42 dias após, desaparecendo, porém, mais cedo que as IgM. Em contraposição, em soro de bovino infectado com *Brucella abortus* virulenta, as IgG persistiram por período maior.

Estas observações constituem a base de vários testes suplementares que visam a distinguir os anticorpos resultantes da infecção e da vacinação, assim como a caracterizar o estado de portador crônico.

Segundo PILET et alii (1972), o Card Test não permite diferenciar os anticorpos resultantes de animais imunizados com vacina aglutinogênica daqueles infectados.

Dentro da conceituação imunológica apresentada, alguns detalhes podem ser extrapolados para o sentido prático. Assim, entre os suínos, foram observados alguns animais com títulos variáveis entre 1/40 até 1/160, na SAL e 1/25 na SAR, que não apresentaram reação no Card Test. MORGAN et alii (1969, 1971) e HRISTOFOROV (1972), citado por CERNYŠEVA et alii (1977), assinalaram que os testes de SAR e SAL para *Brucella* sp podem, às vezes, fornecer resultados inespecíficos. MORGAN et alii (1969) acrescentam, ainda, que certos soros com nenhuma UI na SAL foram positivos no teste de Rosa Bengala em placa, ao passo que alguns soros com 100 a 160 UI foram negativos. Todos os soros com mais de 200 UI na SAL foram positivos no RBP.

De acordo com estudos de especialistas (FAO/WHO, 1971), as provas de fixação de complemento, de antiglobulina de Coombs, os testes alérgicos e a hemo-soro-aglutinação, podem determinar reações falsas negativas ou falsas positivas. Isto tem sido demonstrado em suínos comprovadamente infectados que não evidenciaram reações nos

testes sorológicos. O fenômeno inverso também tem sido verificado, registrando-se reações a baixos títulos de anticorpos, na ausência de infecção declarada. Com o emprego do Card Test, por ação do Rivanol, pela inativação da IgM por aquecimento a 56°C ou através da intervenção do 2-Mercapto-etanol, mostraram-se estes processos satisfatórios para a redução das reações falsas positivas, não revelando tantos animais infectados quanto a prova padrão de hemossoro-aglutinação. Baseado nestas observações, NICOLETTI (1967) aponta o Card Test como o processo mais eficiente na triagem de suínos infectados, quando não se analisam todos os constituintes de um rebanho.

Ainda, a título de apresentação das anomalias reacionais, relata-se o achado de um bovino vacinado, cujo título na SAL foi de 1/160, negativo no Card Test. Em contraposição, outro espécimen com título 1/40 na SAL, revelou-se positivo no Card Test. Todavia, destacam-se os níveis de aglutininas desses soros observados em relação a *Y. enterocolitica* 9, respectivamente 1/80 e 1/1280.

Com relação aos suínos, o Card Test foi positivo na quase totalidade das amostras analisadas quanto a SAR, a SAL, ou ambas, foram positivas.

Numa tentativa de explicar estes fenômenos paradoxais, PILET et alii (1972) enfatizam que o Card Test parece identificar os animais infectados em fase mais precoce que a SAL, sendo frequentemente positivo, quando esta é negativa ou inconclusiva, mas a fixação do complemento é positiva. Nesta etapa evolutiva, especialmente onde a amostra B-19 é regularmente usada como vacina, os resultados do RPB devem ser confirmados pelo uso do teste de fixação de complemento.

MORGAN (1967), verificou melhor correspondência entre o Card Test e a fixação de complemento do que entre Card Test e SAL.

Diante disto, PILET et alii (1972) aventam várias hipóteses quanto à superioridade do Card Test sobre a SAL: a influência do pH, o meio albuminoso (pois o soro não é diluído em solução fisiológica) ou, simplesmente, a re-

6. CONCLUSÕES

Os resultados da análise dos 364 soros de bovinos e suínos submetidos às provas de soro-aglutinação rápida (em placa), soro-aglutinação lenta (em tubo) e Card Test, para o diagnóstico da brucelose, e de soro-aglutinação lenta para *Yersinia enterocolitica* sorotipos 3 e 9, nos permitiram concluir que:

1) ficou demonstrada a ocorrência de reações cruzadas entre *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9;

2) todos os testes utilizados para o esclarecimento do diagnóstico de brucelose evidenciaram em diferentes escalas as interferências antigênicas entre *Brucella* sp e *Y. enterocolitica* 9;

3) o Card Test e a SAR provaram ser os métodos mais indicados para caracterizar sorologicamente a infecção por *Brucella* sp nos suínos, ao passo que a SAR detectou menor número de reagentes cruzados entre os bovinos; porém, nenhum dos testes empregados é capaz de discriminar as infecções específicas;

4) as duas espécies animais analisadas mostraram-se sensibilizadas por *Y. enterocolitica* 9, entretanto, não demonstraram eleição de determinada espécie sobre outra;

5) foram detectadas aglutininas em títulos elevados para *V. enterocolitica* 3 nos bovinos e suínos, sugerindo uma participação ativa deste sorotipo nos hospedeiros;

6) confrontando as respostas reacionais aos sorotipos 3 e 9 de *V. enterocolitica* nos bovinos e suínos, não se caracterizou predominância de um dos sorotipos nos espécimens de bovinos, enquanto que nos suínos foi observada a prevalência de reagentes ao sorotipo 9;

7) como nenhum dos testes empregados demonstrou eficácia absoluta para diferenciar a sensibilização por *Brucella* sp e *V. enterocolitica* 9, torna-se necessário instituir um método que permita distinguir as infecções específicas;

8) há necessidade de se dar continuidade a este estudo com a tentativa do isolamento de *V. enterocolitica* 9 e outros sorotipos, dos animais reagentes nos testes sorológicos para *Brucella* sp e *V. enterocolitica* 9, com o intuito de avaliar a real ocorrência da infecção por *V. enterocolitica* em nosso meio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHVONEN, P. & JANSSON, E. Cross - Reaction between Brucellae and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., Oslo, (Suppl.) 101:57, 1968.
2. AHVONEN, P.; JANSSON, E.; AHO, K. Marked Cross agglutination between Brucellae and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. Acta Path. Microbiol Scand., Copenhagen, 75:291-5, 1969a.
3. AHVONEN, P. & SIEVERS, K. *Yersinia enterocolitica* infection associated with Brucella agglutinins. Clinical features of 24 patients. Acta Med. Scand., Stockholm, 185:121-5, 1969b.
4. AHVONEN, P.; THAL, E.; VASENIUS, H. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in animals in Finland and Sweden. Contr. Microbiol. Immun., Basel, 2:135, 1973
5. ALTON, G.G. & JONES, L.M. La brucellose techniques de laboratorio. Genève, O.M.S., 95p, 1969.
6. ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. Las tecnicas de laboratorio en brucelosis. Genebra, O.M.S., 2a. ed, 175p, 1976.
7. ARAÚJO, R.F. Avaliação das qualidades das vacinas B-19 fabricadas no Brasil. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1976. 47p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).

8. BOCKEMÜHL, J. & ROTH, J. *Brucella* titres in sub-clinical infections due to serotype 0: 9 in a pig breeding farm. Zbl. Bakt., Stuttgart, 240a(1):86-93, 1978.
9. ČERNYŠEVA, M.I.; KNJAZEVA, E.N.; EGOROVA, L.S. Study of the plate agglutination test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. Bull. W.H.O., Geneve, 55(6):669-74, 1977.
10. CORBEL, M.J. Characterization of antibodies active in the Rose Bengal Plate Test. Vet. Rec., London, 90(17):484-5, 1972.
11. CORBEL, M.J. Immunological properties of an antigen from *Yersinia enterocolitica* serotype 9 cross-reacting with *Brucella* agglutinogens. Contr. Microbiol. Immun., Basel, 2:150-6, 1973a.
12. CORBEL, M.J. The nature of the antibody response to *Yersinia enterocolitica* 9 in cattle. J. Hyg., London, (Camb.), 71:309-23, 1973b.
13. CORBEL, M.J. The serological relationship between *Brucella* sp, *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* of Kauffman white group N. J. Hyg., London, (Camb.), 74(1):151-71, 1975a.
14. CORBEL, M.J. Stimulation of protective immunity to *Salmonella* Kauffman - White group N serotypes by *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* antigens. Brit. Vet. J., London, 131:625-6, 1975b.
15. CORBEL, M.J. & CULLEN, G.A. Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. J. Hyg., London, (Camb), 68(519-30, 1970.
16. CORBEL, M.J. & DAY, C.A. Assessment of fluorescent antibody absorption procedure for differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* 9 and *Brucella abortus* in cattle. Brit. Med. J., London, 129(5):67-71, 1973.

17. DANIELS, J.J.H.M. & GOUDZWAARD, C. Enkele stammen van een op *Pasteurella pseudotuberculosis* gelykend niet geïdentificeerd species, geïsoleerd bij kanadieren. I. Diergeneesk., 88(2):96-102, 1963 apud MOLLARET, H.H. L'infection humaine a "*Yersinia enterocolitica*". Path. Biol., Paris, 14(19-20):981-90, 1966.
18. DIAZ, R. Estudio de las relaciones antigenicas entre *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 y otras especies bacterianas Gram-negativas. Microbiol. Esp., Madrid, 27:1-4, 1974.
19. DIAZ, R. & DORRONSORO, L. Contribución al diagnóstico serológico de Brucelosis y Yersiniosis. I. Utilidad de la reacción de precipitación en gel. Rev. Clin. Esp., Madrid, 121(4):367-72, 1971.
20. DIAZ, R.; JONES, L.M.; LEONG, D. & WILSON, J.R. Surface antigens of smooth Brucellae. J. Bact., Washington, 96(4):893-901, 1968.
21. DIAZ, R.; LACALLE, R.; MEDRANO, M.P.; LEONG, D. Immunological activities of the endotoxin from *Yersinia enterocolitica* strains M.Y.79. In: Proc. Vth Int. Congr. Infect. Dis., Vienna, 2, Bacteria I, p.11-7, 1970 apud HURVELL, B. Serological cross-reactions between *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Acta Path. Microbiol. Scand., Copenhagen, (Sect. B) 81(1):105-12, 1973.
22. DIAZ, R. & LEVIEUX, D. Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G₁ et G₂ dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. C.R. Acad. Sci., Paris, 274:1953-6, 1972.
23. DICKINSON, A. & MOQUOT, G. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. I. Enterobacteriaceae, and other gram negative bacteria. J. Appl. Bact., New York, 24(3):252-84, 1973.

24. FALCÃO, D.P.; EWING, W.H.; BRITT, L.E. Relações antigênicas entre *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* com outras enterobactérias. Rev. Microbiol., São Paulo, 9(1):18-23, 1978.
25. FALCÃO, D.P.; GIORGI, W.; IMBRIANI, E.M.M.; PINCETTA, L.A.; SENTONE, E.H.T. Anticorpos anti-*Y. enterocolitica* em soros de suínos. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Rio de Janeiro, 1979. Resumos.
26. FAO/WHO. Joint Expert Committee on Brucellosis. 5th Reports nº 85/464, 76p. Roma, 1971.
27. FREDERIKSEN, W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis* - like bacterial ("Bacterium enterocoliticum") and "Pasteurella X". In: Proc. XIVth Scand. Congr. Path. Microbiol., Copenhagen, p.103-4, 1964 apud NILEHN, B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Path. Microbiol. Scand., Copenhagen, (Suppl.) 206:1-45, 1969.
28. FRIBOURG-BLANC, A. Diagnóstico sérologique de la brucellose para la technique d'immuno-fluorescence. Pr. Méd., Paris, 78:271-2, 1970.
29. GIORGI, W.; MATERA, A.; MOLLARET, H.H.; CASTRO, A.F.P. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* de abscessos hepáticos de saguis (*Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus*). Arq. Inst. Biol. São Paulo, São Paulo, 36(2):123-7, 1969.
30. HASSIG, A.; KARRER, J.; PUSTERLA, F. Über pseudo-tuberculose beim menschen. Schweiz. Med. Mschr., Basel, 79(41):971-3, 1949.
31. HOFER, E. Dados não publicados (1979).
32. HRISTOFOROV, L. Vrt. Med. Nanki, (10):91-8, 1972 apud ČERNYŠEVA, M.I.; KNJAZEVA, E.N.; EGOROVA, L.S. Study of the plate agglutination test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. Bull. W.H.O., Genève, 55(6):669-74, 1974.

33. HUBBERT, W.T. Yersiniosis in mammals and birds in the United States. Case reports and review. Am. J. Trop. Med. Hyg., Lawrence, 21(4):458-63, 1972.
34. HURVELL, B. Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Immunodiffusion and immuno-electrophoresis. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 13(4):472-3, 1972.
35. HURVELL, B. Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Agglutinating activity of 19 S and S antibodies against somatic antigen of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* type IX. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 14(3):474-88, 1973.
36. HURVELL, B.; THAL, E.; CARLSSON, H.E.; LINDBERG, A.A. Studies on serological cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* and gemis *Brucella*. In: Proc. 20th World Vet. Congr. Thessaloniki, 2:1801-6, 1976.
37. JONES et alii (dados não publicados) apud DIAZ, R. Estudio de las relaciones antigenicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas Gram-negativas. Microbiol. Esp., Madrid, 27:1-14, 1974.
38. KARLSSON, K.A.; HURVELL, B.; THAL, E. On the detection of *Yersinia enterocolitica* by the immunofluorescent method. In: Contr. Microbiol. Immun., Basel, 2:71-5, 1973.
39. KNAPP, W. & THAL, E. Untersuchungen über die kulturell-biochemischen, serologischen, tierexperimentellen und immunologischen eigenschaften einer vorläufig "Pasteurella X" benannten bakterienart. Zbl. Bakt. Abt. I., Stuttgart, 190(4):472-84, 1963.
40. KROGSTAD, O.; TEIGE, J.JR.; LASSEN, J. *Yersinia enterocolitica* type 2 associated with disease in goat. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 13(4):594-6, 1972.

41. LANGFORD, E.V. *Yersinia enterocolitica* isolated from animals in the Fraser Valley of British Columbia. Canad. Vet. J., Ottawa, 13:109-13, 1972.
42. LEONG, D.; DIAZ, R.; MILNER, K.; RUDBACH, J.; WILSON, J.B. Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. Infect. Immun., Washington, 1: 174-82.
43. LEVIEUX, D. Bovine immunoglobulins and brucellosis. I. Purification of immunoglobulins and preparation of specific antisera. II. Activity of serum Ig G₁, Ig G₂ and IgM in agglutination, Coombs, CF and Rose Bengal Tests Immunoglobulines bovines et brucellose. I, II. Ann. Rech. Vet., Paris, 5(3):32-342, 343-53, 1974.
44. MARX, A.; SANDULACHE, R.; POP, A.; CERBU, A. Biochemical basis of the serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. Ann. Microbiol., Paris, 126B:435-45, 1975
45. MAYR, N.S.; WHITE, G.D.; SCHUBERT, F.K. *Yersinia enterocolitica* infection in the bush baby (Galago). Vet. Rec., London, 86:69-71, 1970.
46. McCLURE, H.M.; WEAVER, R.E.; KAUFMANN, A.F. Pseudo-tuberculosis in nonhuman primates: infection with organisms of the *Y. enterocolitica* group. Lab. Anim. Sci., Joliet, 21(3):376-82, 1971.
47. MOLLARET, H.H. Pasteurelose et Yersiniose. Gaz. Med. Fr., Paris, I-X:3632-44, 1966.
48. MOLLARET, H.H. & CHEVALIER. Contribution a l'étude d'un nouveau groupe de germes proches du bacille de Malassez et Vignal. Caractères cultureux et biochimiques. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 107(1):121-7, 1964.
49. MOLLARET, H.H. & DESTOMBES, P. Les germes "X" en Pathologie Humaine. Pr. Med., 72(49):2913-5, 1964.
50. MOLLARET, H.H. & GUILLON, J.C. Contribution a l'étude

- d'un nouveau groupe de germes (*Yersinia enterocolitica*) proches du Bacille de Malassez et Vignal. II. Pouvoir pathogène expérimental. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 109(4):608-13, 1965.
51. MOLLARET, H.H. & LUCAS, A. Sur les particularités biochimiques de souches de *Yersinia enterocolitica* isolées chez les lièvres. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 108(1):121-5, 1965.
52. MORGAN, M.J.B. The serological diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Rec., London, 80(21):612-21, 1967
53. MORGAN, M.J.B. Irish. Vet. J., 25:214-9, 1971 apud ČERNYSEVA, M.J.; KNJAZEVA, E.N.; EGOROVA, L.S. Study of the plate agglutination test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. Bull. W.H.O., Geneve, 55(6):669-74, 1977.
54. MORGAN, W.J.B.; MacKINNON, D.J.; LAWSON, J.R.; CULLEN, G.A. The Rose Bengal Plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec., London, 85(23):636-41, 1969.
55. NICOLETTI, P. Utilization of the Card Test in brucellosis eradication. J. Amer. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 151(12):1778-83, 1967.
56. NILEHN, B. Studies on *Yersinia enterocolitica*. Characterization of 28 strains from human and animal sources. Acta Path. Microbiol. Scand., Copenhagen, 69:83-91, 1967.
57. NILEHN, B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Thesis. Acta Path. Microbiol. Scand., Copenhagen, (Suppl) 20:1-45, 1969.
58. NILEHN, B. Host range, Temperature, Characteristics, and Serologic relationship among *Yersinia* phages. In: Cont. Microbiol. Immun., Basel, 2:59-67, 1973.
59. PEDERSEN, K.B. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Danish swine and dogs. Acta Path. Microbiol.

- Scand., Copenhagen, (Sect. B), 84:517-8, 1976.
60. PILET, CH.; TOMA, B.; ANDRÉ, G. Diagnostic sérologique de la Brucellose par l'Épreuve à l'Antigène Tamponné (EAT) ou Card Test. Cah. Méd. Vét., Paris, 41:5-19, 1972.
61. PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. Livraria Novel S.A., São Paulo, 5a. ed.
62. SCHLEIFSTEIN, J.I. & COLEMANN, B. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man. N.Y. St. J. Med., Lake Succren, 39(18):1749-53, 1939.
63. SCHLEIFSTEIN, J.I. & COLEMANN, M.B. *Bacterium enterocoliticum*. A.R. Divis. Labor. Res., New York State Department of Health, 56, 1943 apud MOLLARET, H.H. Infection humaine a "*Yersinia enterocolitica*". Path. Biol., Paris, 14(19-20):981-90.
64. SIEGEL, S. Estatística no paramétrica. Ed. Trillas, México, 2a. ed., 1975.
65. TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; FUKUDA, T.; KIRAYAMA, N.; SANEKAKA, T.; TAKAHASHI, M.; KUBOTA, M. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from pigs. J. Jap. Vet. Med. Ass., Tokyo, 27(6):278-81, 1974.
66. TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; ITAGASHI, K. Studies on *Yersinia enterocolitica*. I. Isolation from swine. Jap. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(5):419-24, 1973.
67. VANDEPITTE, J.; WAUTERS, G.; ISEBAERT, A. Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium. In: Cont. Microbiol. Immun. Yersinia, Pasteurella Francisella. Karger-Basel, 2:111-9, 1973.
68. Van LOGHEM, J.J. La classification du baccille pesteux. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 72:975, 1946,
69. VASCHENOK, G.I.; VOLOKHOV, S.V.; SERGEEVA, N.A.; PUNKO, T.A.; BAKULINA, L.I.; DENISOVA, N.F.; CHAPKEVICH, O. B.; BALASHOVA, L.M. Characteristics of strains of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated from some species of domestics animals (dog, cat ,

- swine). Mikrob. Epid. Immun., Moscou, 1:104-7, 1977.
70. WAUTERS, G. Contribution a l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'agrégé de l'enseignement supérieur. Université Catholique de Louvain. Vander-éditeur, Bruxelles, 1970.
71. WAUTERS, G.; LE MINOR, L.; CHALON, A.M. Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 120:631-42, 1971.
72. WAUTERS, G.; LE MINOR, L.; CHALON, A.M.; LASSEN, J. Supplément auschema antigénique de *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 122:954-6, 1972.
73. WINBLAD, S. Studies on serological typing of *Yersinia enterocolitica*. Acta Path. Microbiol. Scand., Copenhagen, 187:115, 1967.
74. WINBLAD, S. Studies on O-Antigen Factors of *Yersinia enterocolitica*. In: Int. Symp. Pseudotuberculosis Progr. Immunobiol. Standard. Karger-Basel, 9:337-42, 1968.
75. WINBLAD, S. Studies on the O Serotype of "*Yersinia enterocolitica*". In: Cont. Microbiol. Immun., Karger-Basel, 2:27-37, 1973.