

FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Yersinia enterocolitica* 0:3 ISOLADAS DE SUÍNOS SADIOS, RIO DE JANEIRO¹

CARLA LOPES DE MENDONÇA², NORMA DOS SANTOS LÁZARO³, VALÉRIO MACHADO DUQUE⁴ e ERNESTO HOFER⁵

ABSTRACT.- Mendonça C.L, Lázaro N.S, Duque V.M. & Hofer E. 1995. [Virulence factors of *Yersinia enterocolitica* 0:3 isolated from healthy pigs, Rio de Janeiro.] Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* 0:3 isolada de suínos sadios, Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 15(1):11-14. Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Inst. Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ 23851-970, Brazil.

Virulence factors were determined in 43 cultures of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3, biotype 4, phagetype VIII, isolated from apparently healthy pigs. Twenty one isolates were from tonsils, twelve from feces, six from colon contents and four from tongues. The *in vitro* tests consisted of examining autoagglutination at 36°C, and absorption of Congo Red. The virulence assays of *Y. enterocolitica* were conducted by *in vivo* tests, testing the invasiveness into guinea-pig eyes and detection of heat stable enterotoxin in suckling mice. The results revealed a higher positivity percentage of the autoagglutination test (76.7%), followed by absorption of Congo Red (53.5%), invasiveness into guinea-pig eyes (20.9%) and detection of heat-stable enterotoxin (7.0%). A higher correlation was found *in vitro* test as compared to *in vivo* tests, which characterized 53.5% *Y. enterocolitica* isolates tested as virulent and which allowed the conclusion that the simultaneous utilization of autoagglutination and absorption of Congo Red tests may be relevant for the identification of pathogenic strains.

INDEX TERMS: *Yersinia enterocolitica*, pathogenicity, swine.

SINOPSE.- Foram pesquisados os fatores de virulência em 43 estirpes de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:3, biotipo 4, lisotipo VIII isoladas de suínos sadios, sendo 21 amostras provenientes de amígdala, 12 de fezes, seis de conteúdo de cólon e quatro de língua. A avaliação da virulência foi verificada pela invasibilidade em olho de cobaia, detecção de enterotoxina termoestável em camundongo lactente, auto-aglutinação a 36°C e absorção do vermelho Congo. Os resultados revelaram um maior percentual de positividade no teste de auto-aglutinação (76,7%), seguido da absorção do vermelho Congo (53,9%), invasibilidade em olho de cobaia (20,9%) e detecção de enterotoxina termoestável (7,0%). Evidenciou-se maior correlação entre os testes realizados "in vitro" quando comparados às provas "in vivo", caracterizando 53,5% das amostras testadas, como virulentas. A utilização simultânea dos testes de auto-aglutinação a 36°C e absorção do vermelho Congo na identificação de cepas patogênicas parecem ser importantes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Yersinia enterocolitica*, patogenicidade, suíno.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, *Yersinia enterocolitica* vem sendo detectada em várias espécies de animais domésticos, sendo os suínos incriminados como os principais reservatórios desta enterobactéria, visto que funcionam como portadores assintomáticos de cepas pertencentes ao mesmo sorotipo encontrado no homem. Entretanto, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de patogenicidade das estirpes isoladas desta espécie animal.

A presença de um plasmídeo de 42 e/ou 82 MDa está associada às diversas peculiaridades, de virulência de *Y. enterocolitica*, destacando-se a produção dos antígenos V e W (Carter et al. 1980), dependência de cálcio a 37°C (Gemski et al. 1980), auto-aglutinação a 36°C (Laird & Cavanaugh 1980), absorção do vermelho Congo (Prpic et al. 1983) entre outros.

Existem relatos de que *Y. enterocolitica* à semelhança de outros enteropatógenos não somente tem a capacidade de invadir células epiteliais como também possui um fator enterotóxico (Pai & Mors 1978, Schiemann & Devenish 1982). A produção de enterotoxina termoestável foi de-

¹ Aceito para publicação em 24 de outubro de 1994.

² Curso de Pós-Graduação em Patologia Veterinária, Área de Concentração, Medicina Veterinária Preventiva, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23851-970.

³ Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

⁴ Bolsista do CNPq (Proc. 822337/87-8).

⁵ Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900.

monstrada em algumas ocasiões (Nunes et al. 1984, Pai & Mors 1978), inclusive com proposta de modificação do teste clássico reduzindo de quatro para duas horas o período de leitura (Nunes & Ricciard 1986). No Brasil, Castro et al. (1983) ao analisarem 20 cepas sorotipo 0:3, biotipo 4, fagotipo VIII provenientes de suínos diarréicos constataram resultados irregulares na produção de enterotoxina termoestável, bem como ausência da capacidade de causar ceratoconjuntivite em olho de cobaia.

Staroniewiewicz (1988), estudando as características de virulência de 13 amostras de *Y. enterocolitica* isoladas de amígdalas de suínos, obteve cinco estirpes pertencentes ao sorotipo 0:3 positivas nos testes de virulência.

A presente investigação teve por objetivo verificar a presença de determinantes de patogenicidade através da capacidade invasora, produção de enterotoxina termoestável, absorção do vermelho Congo e do fenômeno de auto-aglutinação em *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:3, biotipo 4, lisotipo VIII provenientes de suínos normais abatidos na Cidade do Rio de Janeiro, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 43 amostras de *Yersinia enterocolitica* 4/03/VIII isoladas de diferentes espécimens de suínos sadios abatidos na cidade do Rio de Janeiro, no período de março a agosto de 1990, sendo 21 provenientes de amígdalas, 12 de fezes, seis de conteúdo de cólon e quatro de língua (Mendonça 1991). As culturas foram estocadas até 6 meses a -20°C em Caldo Infuso de Cérebro-Coração (Caldo BHI-Merk) adicionado de glicerol a 15% e posteriormente analisadas quanto a determinadas características de virulência através dos seguintes testes.

Invasibilidade em olho de cobaia. Realizada segundo metodologia descrita por Serény (1955). Os animais foram observados por um período de sete dias e em todos os que revelaram a conjuntivite, efetuou-se a tentativa de reisolamento semeando o espécimen clínico em agar Desoxicolato-Citrato incubado a 25°C por 48 horas.

Deteção de enterotoxina termoestável (ST). Segundo as metodologias propostas por Dean et al. (1972) e Pai & Mors (1978), mas, reduzindo-se o tempo de leitura de 4 horas para 2 horas (Nunes & Ricciardi 1986). Para tal foram adotados como resultados positivos aqueles cuja relação intestino/carga foi > 0,083.

Teste de auto-aglutinação a 36°C. Efetuado de acordo com as especificações de Aulisio et al. (1983) sendo considerado positivo quando a aglutinação foi verificada apenas no tubo incubado à temperatura de 36°C, mostrando um crescimento homogêneo quando incubado a 25°C. O crescimento homogêneo em ambas as temperaturas é dado como prova negativa.

Teste da absorção do vermelho Congo. Adotou-se a orientação de Riley & Toma (1989), sendo consideradas independentes de cálcio (CRMOX-) as amostras que apresentaram colônias de grandes diâmetros, não coradas. As CRMOX+ (Cálcio-dependentes) produziram concomitantemente pequenas colônias vermelhas e grandes não coradas. Todas as amostras CRMOX- foram submetidas às provas da fermentação da salicina e hidrólise da esculina e incubadas a 36°C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste da invasibilidade em olho de cobaia (IOC), nove amostras (20,9%) foram consideradas invasoras (Quadro 1). Nenhuma provocou a clássica ceratoconjuntivite à semelhança de *Shigella* (Serény 1955), mas apenas uma conjuntivite de intensidade variável, revelando a hiperemia e edema conjuntival, com ou sem exsudato. Em contraposição, Feeley et al. (1979) e Mors & Pai (1980) relatam o envolvimento da córnea, levando a uma ceratoconjuntivite provocada por amostras pertencentes ao sorotipo 0:8. Contudo, resultados semelhantes aos nossos, com produção apenas de conjuntivite foram relatados

Quadro 1. Comportamento das amostras de *Yersinia enterocolitica* nas provas de auto-aglutinação (AA), absorção do vermelho Congo (AVC), invasibilidade em olhos de cobaia (IOC) e detecção enterotoxina termoestável (ST)

Amostras	Espécimens	Testes de virulência			
		AA	AVC	IOC	ST
1	Amígdala	+	-	-	-
2	Amígdala	-	-	-	-
3	Amígdala	-	-	-	-
4	Amígdala	-	-	-	-
5	Amígdala	+	-	+	-
6	Amígdala	+	+	-	-
7	Amígdala	+	+	-	-
8	Amígdala	+	+	+	+
9	Amígdala	+	+	+	-
10	Amígdala	+	+	+	-
11	Amígdala	-	-	-	-
12	Amígdala	+	-	-	-
13	Amígdala	+	+	-	-
14	Amígdala	+	+	-	-
15	Amígdala	+	-	-	-
16	Amígdala	+	+	-	-
17	Amígdala	+	+	-	-
18	Amígdala	+	+	+	-
19	Amígdala	+	+	-	-
20	Amígdala	+	-	-	-
21	Amígdala	+	-	-	-
22	Fezes	-	-	-	-
23	Fezes	-	-	-	-
24	Fezes	+	+	-	-
25	Fezes	+	+	+	+
26	Fezes	+	+	-	-
27	Fezes	+	+	+	-
28	Fezes	+	+	-	-
29	Fezes	+	-	-	-
30	Fezes	+	+	-	-
31	Fezes	+	+	+	-
32	Fezes	-	-	-	-
33	Fezes	+	+	-	-
34	Conteúdo de cólon	-	-	-	-
35	Conteúdo de cólon	-	-	+	-
36	Conteúdo de cólon	-	-	-	-
37	Conteúdo de cólon	+	+	-	-
38	Conteúdo de cólon	+	+	-	-
39	Conteúdo de cólon	+	-	-	-
40	Língua	+	+	-	+
41	Língua	+	+	-	-
42	Língua	+	-	-	-
43	Língua	+	-	-	-

por Toledo et al. (1982) e Nunes & Ricciardi (1986) ensaiando com *Y. enterocolitica* 0:3. O reisolamento do microrganismo previamente inoculado foi verificado em todas as amostras positivas.

No teste de detecção de enterotoxina termoestável (ST), três amostras (7,0%) caracterizaram-se como enterotoxigênicas (Quadro 1). Confrontando-se os resultados, Nunes et al. (1984) encontraram um índice de 88,9% de amostras produtoras de enterotoxina ST, onde acreditavam haver uma relação do elevado percentual, com a redução do tempo de leitura de 4 para 2 horas resultando, com isso, um maior número de amostras positivas. Apesar de que foi diminuído o tempo para 2 horas, observou-se um pequeno índice de positividade. Talvez este resultado esteja relacionado ao período de estocagem das amostras, o que acarretaria na perda da capacidade de produzir enterotoxina ST, caso esta seja mediada por plasmídeo como ocorre em colibacilos enterotoxigênicos (Toledo et al. 1982). Um aspecto interessante que foi observado refere-se a ausência de uma conotação entre a produção de enterotoxina ST e outros testes utilizados. Aliás sob esse prisma, salienta-se que Schiemann (1981) assinalou que a enterotoxina ST parece não ser um ponto fundamental na patogenicidade de *Y. enterocolitica*, visto que foi possível provocar diarreia em um animal de laboratório, utilizando-se uma amostra não toxigênica, porém invasora.

No teste de auto-aglutinação (AA), 33 amostras (76,7%) foram positivas (Quadro 1). A justificativa do fenômeno da auto-aglutinação, relacionado a cepas virulentas de *Yersinia* sp ainda é obscura. Acredita-se haver uma relação com determinantes de virulência conhecidos de *Yersinia*. Assim como *Y. pestis*, as amostras de *Y. enterocolitica* também possuem o antígeno V e W, responsável pela auto-aglutinação; por sinal, ambos são dependentes da temperatura de incubação (Laird & Cavanaugh 1980).

Quanto a prova de absorção do vermelho Congo (AVC), 23 amostras (55,3%) apresentaram resultados positivos (Quadro 1), sendo portanto consideradas potencialmente patogênicas (Riley & Toma 1989). As amostras negativas foram submetidas aos testes da hidrólise da esculina e fermentação da salicina, que se mostraram negativo e positivo respectivamente, levando-nos a acreditar que se tratavam de amostras virulentas, não havendo com isso, necessidade de ser empregado o teste da atividade da pirazinamidase. Confrontando os resultados, observa-se uma correlação muito acentuada entre os testes "in vitro" (auto-aglutinação a 36°C e absorção do vermelho Congo), quando comparada à prova da invasibilidade. No entanto, salienta-se que estes três indicadores de virulência são codificados por um mesmo plasmídeo (Gemski et al. 1980, Laird & Cavanaugh 1980, Prpic et al. 1983), o que justifica serem esperados resultados aproximados, nos testes mencionados.

Comparando-se os resultados dos testes "in vitro" verifica-se que das 33 amostras auto-aglutináveis, 23 foram

positivas na prova de absorção do vermelho Congo, sendo que todas as 10 amostras negativas no teste da AA, também foram negativas na AVC.

Estes achados sugerem que a associação dessas duas provas constitui um forte indício de patogenicidade admitindo-se que as 23 amostras (53,5%) positivas em ambos os testes, podem ser consideradas potencialmente patogênicas, inclusive, respaldando-se na citação de Laird & Cavanaugh (1980), que recomendam a auto-aglutinação como um processo presuntivo na avaliação da patogenicidade de *Y. enterocolitica*.

Quanto à IOC anotou-se um menor índice de positividade (9 amostras) em relação aos testes "in vitro", e embora a maioria tenha sido positiva na auto-aglutinação e absorção do vermelho Congo, uma cultura positiva na IOC foi negativa na AA e AVC e outra somente na AVC.

A detecção de um menor número de amostras positivas no teste da IOC, sugere que independente da possibilidade de perda de plasmídeo devido à manipulação e estocagem das amostras é oportuno considerar a resistência individual do animal do mecanismo de defesa à infecção.

Uma estreita correlação entre auto-aglutinação, dependência de cálcio e invasibilidade em olho de cobaia, foi relatada por Schiemann et al. (1981), que observaram, em todas as amostras de *Y. enterocolitica* testadas resultados comuns de positividade ou negatividade, justificando o envolvimento de um mesmo plasmídeo de virulência.

Pelos resultados obtidos, admite-se que a associação das provas de auto-aglutinação e de absorção do vermelho Congo é valiosa na caracterização de cepas virulentas. Por outro lado, os dados obtidos ratificam as observações de Mendonça (1991) que evidenciam a importância do suíno no ciclo epidemiológico da doença, desempenhando o papel de portador sadio de estirpes de *Yersinia enterocolitica* 4/0:3/VIII potencialmente patogênicas para a espécie humana.

Agradecimentos.- Os autores agradecem a valiosa colaboração da técnica Sr^a Rosemary Fernandes Teixeira Ferreira e o suporte financeiro ofertado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 406775/89-3).

REFERÊNCIAS

- Auliso C.C.G., Stanfield J.T., Weagant S.D. & Hill W.E. 1983. Yersiniosis associated with tofu consumption: Serological, biochemical and pathogenicity studies of *Yersinia enterocolitica* isolates. J. Food. Prot. 46:226-230.
- Carter P.B., Zahorchan R.J. & Brubaker R.R. 1980. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 28:638-640.
- Castro A.F.P., Ricci L.C., Almeida A.C., Oliveira M.S. & Barcellos D.E.S.N. 1983. Virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs. Revta Microbiol., S. Paulo, 14:48-54.
- Dean A.G., Ching Y.C., Williams R.G. & Harden L.B. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. J. Infect. Dis. 25:407-411.
- Feeley J.C., Wells J.G., Tsai T.F. & Puar N.D. 1979. Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol. 5:329-334.

- Gemski P., Lazare J.R. & Casey T. 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.
- Laird W.J. & Cavanaugh D.C. 1980. Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersinia*. *J. Clin. Microbiol.* 11:430-432.
- Mendonça C.L. 1991. *Yersinia enterocolitica* em suínos normais: análises bacteriológicas e epidemiológicas. Tese de Mestrado, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.
- Mors V. & Pai C.H. 1980. Pathogenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28:229-294.
- Nunes M.P. & Ricciardi I.D. 1981. Detection of *Yersinia* heatstable enterotoxin by suckling mouse bioassay. *J. Clin. Microbiol.* 13:783-786.
- Nunes M.P. & Ricciardi I.D. 1986. *Yersinia enterocolitica*: isolamento concomitante de fezes de humanos e cão. *Revta Microbiol., S. Paulo*, 17:220-224.
- Nunes M.P., Toledo M.R.F., Trabulsi L.R. & Ricciardi I.D. 1984. Invasibilidade e enterotoxigenicidade de *Yersinia enterocolitica* e das espécies atípicas de *Yersinia* isoladas do homem e cães no Brasil. *Revta Microbiol., S. Paulo*, 15:222-226.
- Pai C.H. & Mors V. 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 19:908-911.
- Prpic J.K., Robins-Browne R.M. & Davey R.B. 1983. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo Red Agar. *J. Clin. Microbiol.* 18:486-490.
- Riley G. & Toma S. 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo Red Magnesium Oxalate Agar Medium. *J. Clin. Microbiol.* 27:213-214.
- Schiemann D.A. 1981. An enterotoxin-negative strain of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 is capable of producing diarrhoea in mice. *Infect. Immun.* 32:571-574.
- Schiemann D.A. & Devenish J.A. 1982. Relationship of Hela Cell infectivity to biochemical serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35:497-506.
- Schiemann D.A., Devenish J.A. & Toma S. 1981. Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 32:400-403.
- Serény B. 1955. Experimental *Shigella* Keratoconjunctivitis: A preliminary report. *Acta Microbiol. Hung.* 2:293-296.
- Staroniewicz Z. 1988. Isolation of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of pigs. *Med. Weteryn.* 44:545-547.
- Toledo M.R.F., Serafin M.B., Horton D.S.P.Q. & Falcão D.P. 1982. Pesquisa de fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica*. *Revta Microbiol., S. Paulo*, 13:143-150.