UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia*
enterocolitica-like**

Priscilla Fernanda Martins Imori

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia*
enterocolitica-like**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Priscilla Fernanda Martins Imori

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Imori, Priscilla Fernanda Martins

“Caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica*-like”. Ribeirão Preto, 2016.

127 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Falcão, Juliana Pfrimer

1. *Yersinia enterocolitica*-like 2. Potencial patogênico 3. Novos marcadores de virulência 4. Genes de virulência 5. Adesão e invasão celular 6. Microscopia eletrônica 7. RNA-seq

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Priscilla Fernanda Martins Imori

Título do trabalho: Caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica*-like

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais Heloísio e
Rose por todo apoio e
incentivo sempre*

Agradecimentos

A Deus por me guiar durante toda a minha trajetória e me dar forças e serenidade nos momentos de dificuldade;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão por toda a minha formação científica e profissional, pela oportunidade da realização deste trabalho, pelo apoio e empenho, pela amizade e por toda a confiança em mim depositada; Muito Obrigada!

Aos amigos do laboratório, Amanda, Beatriz, Carolina, Fábio, Felipe, Fernanda, Miliane e Roberto, pela disposição em ajudar com os experimentos, sugestões e discussões científicas e pelos momentos agradáveis no laboratório;

Aos meus pais Heloísio e Rose, aos meus irmãos Lígia e Fábio, aos meus tios Tânia e Carlos e às minhas avós Angelina e Thereza por sempre me apoiarem, pelo amor incondicional e por compreenderem as minhas ausências; Amo vocês!

Ao meu namorado Alex por estar sempre ao meu lado, mesmo de longe, me apoiando em todos os momentos; Amo você!

Aos amigos Ariane, Juliana, Leandro, Stella e Vânia por me acompanharem durante esta jornada e tornarem os meus dias muito mais divertidos; Amo vocês!

À Vania Claudia de Albuquerque pelo auxílio administrativo, pela ajuda com o resumo em espanhol e pela amizade e *à Jaqueline Passaglia e Eliane Figueiredo* pelo apoio técnico no decorrer deste trabalho;

À Prof^a Dr^a Danielle Palma de Oliveira pelo uso da sala de cultura celular no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e *ao técnico Klaus Alvaro Guerrieri Accoroni* pelo apoio técnico;

À Prof^a Dr^a Elaine Cristina Pereira de Martinis pelo uso da sala de cultura celular no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e *aos técnicos Lucas Oliveira Sousa e Vanessa Maciel de Souza* pelo apoio técnico;

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura pelo uso dos sequenciadores no Laboratório de Bioquímica Clínica - Sala de Sequenciamento do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e *aos técnicos Emerson de Souza Santos e Lucas Oliveira Sousa* pelo apoio técnico;

Aos amigos do laboratório do Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Aline, Alinne, Emerson, Fernanda, Laís, Lucas, Luís, Hamilton e Silveli pela disposição em ajudar com os experimentos, sugestões e discussões científicas e pelos momentos agradáveis no laboratório;

Ao Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha do Departamento de Patologia, Genética e Evolução, Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelas análises das microscopias eletrônicas no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e *à técnica Lígia G. V. B. Santoro* pelo apoio técnico;

Aos funcionários da FCFRP-USP, especialmente aos funcionários da pós-graduação Henrique Theodoro e Rosana Florêncio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo CNPq nº 141800/2012-7 e 162607/2015-6);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio pesquisa;

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Life always begins with one step
outside of your comfort zone.”*

Shannon L. Alder

RESUMO

IMORI, P. F. M. **Caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica*-like** 2016. 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dentre as 18 espécies do gênero *Yersinia*, as espécies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* foram extensivamente caracterizadas em diversos aspectos como ecologia, epidemiologia e mecanismos de patogenicidade. Sete das 15 espécies restantes (*Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* e *Y. rohdei*), usualmente conhecidas como *Y. enterocolitica*-like, até o momento, não tiveram seu potencial patogênico caracterizado e são, geralmente, consideradas não-patogênicas. Entretanto, dados da literatura sugerem que algumas dessas espécies possam causar doença. Esses dados estimularam o surgimento de questões sobre os mecanismos pelos quais as espécies de *Y. enterocolitica*-like possam interagir com as células do hospedeiros e causar doenças. Esse projeto teve como principal objetivo caracterizar o potencial patogênico de linhagens de *Y. enterocolitica*-like, especificamente das espécies *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*. No presente trabalho, o potencial patogênico de 118 linhagens de *Y. enterocolitica*-like (50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* e 13 *Y. kristensenii*) foi avaliado pela pesquisa da presença dos genes relacionados à virulência *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC*, *ystA*, *ystB* e *virF* por PCR. Além disso, a habilidade de algumas linhagens de *Yersinia* de aderir e invadir células Caco-2 e HEp-2 após diferentes períodos de incubação, bem como, de sobreviver no interior de macrófagos humanos U937 foi testada. Aspectos morfológicos da adesão bacteriana foram visualizados por microscopia eletrônica. Finalmente, a presença de possíveis novos mecanismos de virulência foi avaliada a partir do sequenciamento de RNA de uma linhagem de *Y. enterocolitica*-like. As linhagens estudadas apresentaram os seguintes genes: *Y. frederiksenii*, *fepA* (44%), *fes* (44%) e *ystB* (18%); *Y. intermedia*, *ail* (53%), *fepA* (35%), *fepD* (2%), *fes* (97%), *hreP* (2%), *ystB* (2%) e *tccC* (35%); e *Y. kristensenii*, *ail* (62%), *ystB* (23%), *fepA* (77%), *fepD* (54%), *fes* (54%) e *hreP* (54%). De modo geral, as linhagens de *Y. enterocolitica*-like tiveram a habilidade de aderir e invadir células Caco-2 e HEp-2 inferior à da linhagem altamente patogênica *Y. enterocolitica* 8081. Contudo, *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461 apresentaram elevado potencial de invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação, os quais foram 45 e 7,2 vezes maiores do que o controle *Y. enterocolitica* 8081, respectivamente, porém, o gene *ail* não foi detectado nessas linhagens. O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937

mostrou que as linhagens de *Y. frederiksenii* FCF 461 (40,0%) e *Y. frederiksenii* FCF 379 (24,6%) tiveram porcentagens de sobrevivência superior à de *Y. enterocolitica* 8081 (13,4%). Todavia, linhagens de *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* apresentaram uma capacidade reduzida de sobreviver em macrófagos. A microscopia eletrônica de varredura mostrou as bactérias em contato com a filipódia celular. As bactérias foram distribuídas tanto individualmente quanto em pequenos aglomerados. Portanto, podemos concluir que a presença dos genes relacionados à virulência encontrados nas *Y. enterocolitica*-like estudadas indicou o possível potencial patogênico de algumas dessas linhagens. Os ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos sugerem que a patogenicidade de *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* possa ser linhagem-dependente. O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 evidenciou o potencial patogênico de algumas linhagens de *Y. frederiksenii*. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem a existência de mecanismos de virulência alternativos aos mecanismos clássicos descritos para *Y. enterocolitica* patogênica. Contudo, a presença de possíveis novos mecanismos de virulência não pode ser verificada, uma vez que a plataforma 454 GS Junior (Roche) não se mostrou adequada para a realização de sequenciamento de RNA de amostras provenientes de interações com células devido à baixa cobertura obtida.

Palavras-chave: *Yersinia enterocolitica*-like, potencial patogênico, novos marcadores de virulência, genes de virulência, adesão e invasão celular, sobrevivência no interior de macrófagos humanos, microscopia eletrônica e RNA-seq

ABSTRACT

IMORI, P. F. M. **Characterization of the pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica*-like strains** 2016. 127f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Among the 18 species of the *Yersinia* genus, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* were extensively characterized in different subjects as ecology, epidemiology and pathogenicity mechanisms. Seven among the remaining 15 species (*Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* and *Y. rohdei*), often called *Y. enterocolitica*-like have not their pathogenic potential characterized and are usually considered to be nonpathogenic. However, literature data suggest that some of these species can cause diseases. These data stimulate the upsurge of questions about the mechanisms of which *Y. enterocolitica*-like species may interact with host cells and cause diseases. The main objective of this project was to characterize the pathogenic potential of *Y. enterocolitica*-like strains, specifically of the species *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* and *Y. intermedia*. This work evaluated the pathogenic potential of 118 *Y. enterocolitica*-like strains (50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* and 13 *Y. kristensenii*) searching for the presence of the virulence-related genes *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC*, *ystA*, *ystB* and *virF* by PCR. Besides, *Yersinia* strains ability of adhesion and invasion to Caco-2 and HEp-2 cells after different pre-incubation periods, and its survival within human macrophages U937 were tested. Morphologic aspects of bacterial adhesion were observed by scanning electronic microscopy. Finally, the presence of new possible virulence mechanisms was evaluated through RNA sequencing of one *Y. enterocolitica*-like strain. The studied strains showed the following genes: *Y. frederiksenii*, *fepA* (44%), *fes* (44%) and *ystB* (18%); *Y. intermedia*, *ail* (53%), *fepA* (35%), *fepD* (2%), *fes* (97%), *hreP* (2%), *ystB* (2%) and *tccC* (35%); and *Y. kristensenii*, *ail* (62%), *ystB* (23%), *fepA* (77%), *fepD* (54%), *fes* (54%) and *hreP* (54%). Usually *Y. enterocolitica*-like strains presented less ability of adhere and invade Caco-2 and HEp-2 cells than the highly pathogenic strain *Y. enterocolitica* 8081. On the other hand, *Y. kristensenii* FCF 410 and *Y. frederiksenii* FCF 461 showed high potential of invasion in Caco-2 cells after 5 days of pre-incubation, which were 45 and 7.2 times higher than the control *Y. enterocolitica* 8081 respectively, but *ail* gene was not found in these strains. Survival assay in human macrophages U937 showed that *Y. frederiksenii* FCF 461 (40.0%) and *Y. frederiksenii* FCF 379 (24.6%) strains presented survival percentages higher than *Y. enterocolitica* 8081 (13.4%). However, *Y. intermedia* and *Y.*

kristensenii strains showed a reduced capability of surviving in macrophages. Scanning electron microscopy showed bacteria at the surface in contact with the cellular filopodia. The bacteria were distributed either individually or in small clumps. Therefore, it may be concluded that the presence of virulence-related genes in some of the *Y. enterocolitica*-like strains indicated their possible pathogenic potential. Mammal cells adhesion and invasion assays suggest that the pathogenicity of *Y. kristensenii* and *Y. frederiksenii* may be strain-dependent. Human macrophages U937 surviving assay highlighted the pathogenic potential of some *Y. frederiksenii* strains. Together, the results suggest the existence of alternative virulence mechanisms other than the classical mechanisms described for pathogenic *Y. enterocolitica*. However, we could not verify the presence of possible new virulence mechanisms because 454 GS Junior (Roche) platform was not suitable for RNA sequencing of strains from cells interaction due its low coverage obtained.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*-like, pathogenic potential, new virulence mechanisms, virulence-related genes, cell adhesion and invasion assays, surviving within human macrophages, electron microscopy and RNA-seq

RESUMEN

IMORI, P. F. M. **Caracterización del potencial patogénico de linajes de *Yersinia enterocolitica*-like**. 2016. 127f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Entre las 18 especies del género *Yersinia*, las especies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* fueron extensivamente caracterizadas en distintos aspectos como ecología, epidemiología y mecanismos de patogenicidad. Siete de las demás 15 especies (*Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* e *Y. rohdei*), usualmente conocidas como *Y. enterocolitica*-like, no han tenido su potencial patogénico caracterizado y han sido consideradas no patogénicas pero los datos de la literatura sugieren que algunas de esas especies puedan causar enfermedades. Estos datos estimularon el surgimiento de cuestiones sobre los mecanismos por los cuales las especies de *Y. enterocolitica*-like puedan interactuar con las células de sus hospederos y causar enfermedades. Este estudio tuvo como principal objetivo la caracterización de potencial patogénico de cepas de *Y. enterocolitica*-like, específicamente de las especies *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*. En este trabajo, el potencial patogénico de 118 cepas de *Y. enterocolitica*-like (50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* y 13 *Y. kristensenii*) fue evaluado por la investigación de los genes relacionados a la virulencia *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC*, *ystA*, *ystB* y *virF* por medio de PCR. Además, se probó la habilidad de algunas cepas de *Yersinia* en adherir e invadir células Caco-2 y HEp-2 después de distintos períodos de incubación, así como, de sobrevivir en el interior de macrófagos humanos U937. Aspectos morfológicos de la adhesión bacteriana fueron visualizados por microscopia electrónica. Finalmente, se evaluó la presencia de posibles nuevos mecanismos de virulencia a partir de la secuenciación de ARN extraído de una cepa de *Y. enterocolitica*-like. Las cepas estudiadas presentaron los siguientes genes: *Y. frederiksenii*, *fepA* (44%), *fes* (44%) e *ystB* (18%); *Y. intermedia*, *ail* (53%), *fepA* (35%), *fepD* (2%), *fes* (97%), *hreP* (2%), *ystB* (2%) y *tccC* (35%); e *Y. kristensenii*, *ail* (62%), *ystB* (23%), *fepA* (77%), *fepD* (54%), *fes* (54%) y *hreP* (54%). En general, las cepas de *Y. enterocolitica*-like tuvieron la habilidad de adherir e invadir células Caco-2 y HEp-2 inferior a de la cepa altamente patogénica *Y. enterocolitica* 8081. Sin embargo, *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461 presentaron elevado potencial de invasión a células Caco-2 después de cinco días de pre incubación, los cuales fueron 45 y 7,2 veces mayores que el control *Y. enterocolitica* 8081, respectivamente, pero el gene *ail* no fue detectado en esas cepas. El ensayo de supervivencia

en macrófagos humanos U937 mostró que las cepas de *Y. frederiksenii* FCF 461 (40,0%) e *Y. frederiksenii* FCF 379 (24,6%) tuvieron porcentuales de supervivencia superior al de *Y. enterocolitica* 8081 (13,4%). Todavía, cepas de *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* presentaron una capacidad reducida de supervivir en macrófagos. La microscopia electrónica de barrido mostró las bacterias en contacto con la filopodia celular, las cuales fueron distribuidas tanto individualmente cuanto en pequeños aglomerados. Así, podemos concluir que la presencia de los genes relacionados a la virulencia encontrados en las *Y. enterocolitica*-like estudiadas indicó el posible potencial patogénico de algunas de esas cepas. Los ensayos de adhesión e invasión a células de mamíferos sugieren que la patogenicidad de *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* pueda ser cepa-dependiente. El ensayo de supervivencia en macrófagos humanos U937 evidenció el potencial patogénico de algunas cepas de *Y. frederiksenii*. Coyuntamente, los resultados obtenidos sugieren que el potencial patogénico de *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* pueda ser cepa-dependiente e indican la posible existencia de mecanismos de virulencia alternativos a los mecanismos clásicos descritos para *Y. enterocolitica* patogénica. Sin embargo, la presencia de posibles nuevos mecanismos de virulencia no pudo ser verificada, una vez que a plataforma 454 GS Junior (Roche) no se mostró adecuada para la realización de secuenciación de ARN de muestras provenientes de interacciones con células debido a la baja cubierta obtenida.

Palabras llave: *Yersinia enterocolitica*-like, potencial patogénico, nuevos marcadores de virulencia, genes de virulencia, adhesión y invasión celular, supervivencia en el interior de macrófagos humanos, microscopia electrónica y ARN-sec

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%	49
Figura 2 -	Micrografia eletrônica de varredura representativa do ensaio de adesão em células Caco-2 e HEp-2	55
Figura 3 -	Eletroferograma representativo da qualidade do RNA total verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o <i>kit</i> RNA 6000 Pico para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	56
Figura 4 -	Eletroferograma representativo da qualidade do RNA total bacteriano após enriquecimento pelo <i>kit</i> MICROBEnrich™ verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o <i>kit</i> RNA 6000 Pico para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	57
Figura 5 -	Eletroferograma representativo da depleção dos rRNA após enriquecimento pelo <i>kit</i> Ribominus™ Transcriptome Isolation verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o <i>kit</i> RNA 6000 Pico para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	58
Figura 6 -	Eletroferograma representativo da fragmentação do mRNA bacteriano por uma solução contendo 100mM de ZnCl ₂ verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o <i>kit</i> RNA 6000 Pico para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	59
Figura 7 -	Eletroferograma representativo da qualidade e do tamanho da biblioteca de cDNA verificados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o High Sensitivity DNA Kit para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	60
Figura 8 -	Histograma representativo de uma corrida de RNA-seq para a avaliação da variação do tamanho das <i>reads</i> obtidas para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410	60
Figura 9 -	Dados fornecidos pelo <i>software</i> Blast2Go sobre funções moleculares referentes aos <i>contigs</i> obtidos para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410 ...	62
Figura 10 -	Dados fornecidos pelo <i>software</i> Blast2Go sobre processos biológicos referentes aos <i>contigs</i> obtidos para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410 ...	63
Figura 11 -	Dados fornecidos pelo <i>software</i> Blast2Go sobre componentes celulares referentes aos <i>contigs</i> obtidos para a linhagem <i>Y. kristensenii</i> FCF 410 ...	64

- Figura 12 -** Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre funções moleculares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081 65
- Figura 13 -** Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre processos biológicos referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081 66
- Figura 14 -** Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferenciação fenotípica das espécies de <i>Yersinia</i> spp.	5
Tabela 2 -	Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de <i>Y. enterocolitica</i> após incubação a 25°C por 48 horas	6
Tabela 3 -	Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de <i>Y. intermedia</i> após incubação a 25°C por 48 horas	11
Tabela 4 -	Bio-sorogrupo, fonte, local e ano de isolamento das 118 linhagens de <i>Yersinia</i> spp. estudadas, incluindo 50 <i>Y. frederiksenii</i> , 55 <i>Y. intermedia</i> e 13 <i>Y. kristensenii</i> , e os controles usados na pesquisa de genes relacionados à virulência, ensaios de adesão e invasão e microscopia eletrônica de varredura	28
Tabela 5 -	Dados gerais sobre os <i>primers</i> e temperaturas de hibridação utilizados para a pesquisa dos genes cromossômicos relacionados à virulência	35
Tabela 6 -	Frequência dos genes relacionados à virulência <i>ail</i> , <i>ystA</i> , <i>ystB</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>fes</i> , <i>hreP</i> , <i>myfA</i> , <i>tccC</i> e <i>virF</i> em 50 linhagens de <i>Y. frederiksenii</i> isoladas de alimentos, ambiente, animal e humanos	49
Tabela 7 -	Frequência dos genes relacionados à virulência <i>ail</i> , <i>ystA</i> , <i>ystB</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>fes</i> , <i>hreP</i> , <i>myfA</i> , <i>tccC</i> e <i>virF</i> em 55 linhagens de <i>Y. intermedia</i> isoladas de alimentos, ambiente, animal e humano	50
Tabela 8 -	Frequência dos genes relacionados à virulência <i>ail</i> , <i>ystA</i> , <i>ystB</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>fes</i> , <i>hreP</i> , <i>myfA</i> , <i>tccC</i> e <i>virF</i> em 13 linhagens de <i>Y. kristensenii</i> isoladas de alimentos, ambiente e animal	50
Tabela 9 -	Médias de adesão e invasão a células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação de 20 <i>Y. frederiksenii</i> , 20 <i>Y. intermedia</i> e 10 <i>Y. kristensenii</i> comparadas à <i>Y. enterocolitica</i> 8081 (em vezes)	51
Tabela 10 -	Adesão e invasão a células Caco-2 após cinco e 12 dias de incubação e a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação de duas <i>Y. frederiksenii</i> (FCF 461 e FCF 379), duas <i>Y. intermedia</i> (FCF 321 e IP 8181), e duas <i>Y. kristensenii</i> (FCF 410 e FCF 604), isoladas de fontes clínicas e não clínicas, comparadas à <i>Y. enterocolitica</i> 8081 (em vezes)	53
Tabela 11 -	Porcentagem de sobrevivência em macrófagos U937 ativados após três dias de pré-incubação de duas <i>Y. frederiksenii</i> (FCF 461 e FCF 379), duas <i>Y. intermedia</i> (FCF 321 e IP 8181), duas <i>Y. kristensenii</i> (FCF 410 e FCF 604) e <i>Y. enterocolitica</i> 8081	54

Tabela 12 -	Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos U937 ativados após três dias de pré-incubação infectados por duas <i>Y. frederiksenii</i> (FCF 461 e FCF 379), duas <i>Y. intermedia</i> (FCF 321 e IP 8181), duas <i>Y. kristensenii</i> (FCF 410 e FCF 604) e <i>Y. enterocolitica</i> 8081	54
--------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ail	<i>Attachment invasion locus</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BB2	<i>Bead buffer 2</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIN	Cefsulodina -irgasan-novobiocina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Escola Paulista de Medicina
F	<i>Forward</i>
HPI	<i>High Pathogenicity Island</i>
Inv	<i>Invasion</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio mínimo essencial
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MILi	Motilidade-indol-lisina
Myf	<i>Mucoid Yersinia factor</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NA	Não se aplica
ND	Não detectado
nt	Nucleotídeos
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
emPCR	PCR em emulsão
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Células polimorfonucleares
pYV	<i>Plasmid for Yersinia virulence</i>
R	<i>Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
spp.	Espécies
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
TAE	Tris Acetato EDTA
tc	<i>Inceticial toxin complex</i>
TE	Tris EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UTTD	<i>Ultra turrax tube driver</i>
V	Variável
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
Yop	<i>Yersinia outer proteins</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
™	<i>Trademark</i>
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
≥	Maior ou igual a
-	Negativo
+	Positivo
(+)	Fracamente positivo
µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
A	Adenina
C	Citosina
CO₂	Dióxido de carbono
g	Força g
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
Kb	Quilobase (s)
KDa	Quilodalton (s)
Kg	Quilograma (s)
mg	Miligrama (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
M	Molar
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
n	Tamanho da amostra
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)

pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
T	Timina
U	Unidade (s)
U\$	Dólares americanos
v	Variável
V	Volt (s)
x	Vez (es)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Gênero <i>Yersinia</i>	2
1.2. Características do gênero <i>Yersinia</i>	3
1.3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	6
1.4. <i>Yersinia enterocolitica</i> -like	8
1.4.1. <i>Yersinia frederiksenii</i>	9
1.4.2. <i>Yersinia intermedia</i>	10
1.4.3. <i>Yersinia kristensenii</i>	11
1.5. Genes relacionados à virulência	12
1.6. Patogênese	17
1.7. Manifestações clínicas	18
1.8. Estudos de patogenicidade de <i>Yersinia</i>	19
1.8.1. Ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos e microscopia eletrônica ...	19
1.8.2. RNA-seq	20
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Linhagens bacterianas	28
4.2. Reconfirmação da pureza, caracterização fenotípica e reconfirmação sorológica .	32

4.3. Armazenamento das linhagens bacterianas	33
4.4. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	33
4.5. Detecção dos genes relacionados à virulência por PCR	34
4.6. Validação da presença dos genes relacionados à virulência por sequenciamento ..	35
4.7. Ensaio de adesão e invasão a células Caco-2 e HEp-2	36
4.8. Ensaio de sobrevivência no interior de macrófagos humanos U937	37
4.8.1. Ensaio de exclusão do azul de tripano	38
4.9. Microscopia eletrônica de varredura	39
4.10. Pesquisa de novos mecanismos de virulência em <i>Y. enterocolica</i> -like por RNA-seq	39
4.10.1. Extração do RNA	39
4.10.2. Enriquecimento do mRNA de <i>Yersinia</i> spp.	40
4.10.3. Preparação da biblioteca de cDNA	42
4.10.4. PCR em emulsão (emPCR)	43
4.10.5. Sequenciamento do transcriptoma	45
4.10.6. Análise do RNA-seq	45
5. RESULTADOS	48
5.1. Reconfirmação da pureza, caracterização fenotípica e reconfirmação sorológica ...	48
5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	48
5.3. Genes relacionados à virulência	49
5.4. Validação dos genes relacionados à virulência detectados por sequenciamento	50
5.5. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 e HEp-2	51
5.5.1. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação	51
5.5.2. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação	51
5.5.3. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após 12 dias de pré-incubação	52
5.5.4. Adesão e invasão bacterianas a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação ..	52
5.6. Ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937	53
5.6.1. Ensaio de exclusão do azul de tripano	54
5.7. Microscopia eletrônica de varredura	54
5.8.1. Extração e verificação da qualidade do RNA total	56
5.8.2. Enriquecimento do mRNA de <i>Yersinia</i> spp.	56

5.8.3. Preparação da biblioteca de cDNA	58
5.8.4. Sequenciamento do transcriptoma	60
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICES	95
ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Yersinia*

O gênero *Yersinia* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales* e família *Enterobacteriaceae* (Bottone, 1997). O nome *Yersinia* foi uma homenagem ao bacteriologista francês Alexandre Emile Jean Yersin, que isolou o agente da peste em 1894, durante uma epidemia em Hong Kong. Cinquenta anos depois, Van Loghem (1944) propôs a criação do gênero *Yersinia* com a finalidade de agregar os organismos *Pasteurella pestis* e *Pasteurella pseudotuberculosis*, os quais estavam incluídos no gênero *Pasteurella*, contudo, apresentavam características distintas das demais espécies daquele gênero. Posteriormente, Frederiksen (1964) renomeou para *Yersinia enterocolitica* o até então denominado *Bacterium enterocoliticum*, que havia sido descrito em 1939, após relatos de surtos de gastroenterite. Em 1972, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana incluiu o gênero *Yersinia* na família *Enterobacteriaceae*, abrangendo as espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (Sulakvelidze, 2000; Falcão e Falcão, 2006; Falcão e Souza, 2015).

Atualmente, o gênero *Yersinia* é composto por 18 espécies. As espécies comprovadamente patogênicas para humanos e/ou animais são *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. *Y. pestis* é causadora de uma infecção sistêmica grave conhecida como peste negra, uma doença frequentemente fatal quando não tratada. Os três principais tipos de infecção causados por *Y. pestis* são peste bubônica, septicêmica e pneumônica, sendo definidos pela natureza dos órgãos colonizados pela bactéria. *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são bactérias enteropatogênicas, que causam infecções intestinais chamadas de yersiniose. Estas infecções podem resultar em enterocolite, linfadenite mesentérica e, raramente, em sepse. Estas três são as espécies mais bem estudadas, tendo sido exaustivamente caracterizadas quanto à sua ecologia, epidemiologia e mecanismos básicos de virulência (Bercovier *et al.*, 1980; Bottone, 1997; Sulakvelidze, 2000; Robins-Browne, 2001; Schrieffer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015). *Y. ruckeri* é um importante patógeno de peixes, sendo o agente da doença da “boca vermelha” (Ewing *et al.*, 1978). *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* e *Y. rohdei* são encontradas no meio ambiente e em alimentos e são consideradas, usualmente, bactérias oportunistas não patogênicas, porém, há relatos de isolamento de algumas dessas espécies em humanos com distúrbios gastrointestinais. Essas espécies são também conhecidas como *Y. enterocolitica*-like (Bercovier *et al.*, 1980; Brenner *et al.*, 1980; Ursing *et al.*, 1980; Bercovier *et al.*, 1984; Aleksic *et al.*, 1987; Wauters *et al.*, 1988; Bottone, 1997; Sulakvelidze, 2000; Robins-Browne, 2001; Schrieffer e Petersen, 2011;

Falcão e Souza, 2015). Finalmente, os mais novos membros do gênero são *Y. aleksiciae* (Sprague e Neubauer, 2005), *Y. similis* (Sprague *et al.*, 2008), *Y. massiliensis* (Merhej *et al.*, 2008), *Y. entomophaga* (Hurst *et al.*, 2011), *Y. nurmii* (Murros-Kontinen, Fredriksson-Ahomaa, *et al.*, 2011), *Y. pekkanenii* (Murros-Kontinen, Johansson, *et al.*, 2011) e *Y. wautersii* (Savin *et al.*, 2014). Pouco se sabe sobre a biologia, patogênese e epidemiologia dessas espécies mais recentemente descritas (Falcão e Souza, 2015). Recentemente, (Neubauer e Sprague, 2015) publicaram um comentário sugerindo que as linhagens classificadas como *Y. wautersii* por Savin *et al.* (2014) não deveriam ser classificadas como uma nova espécie, devendo ser mantidas no "Korean Group" do Complexo *Y. pseudotuberculosis*.

1.2. Características do gênero *Yersinia*

Yersinia spp. são pequenos bacilos Gram-negativos, medindo aproximadamente 0,5 x 0,8 µm de largura por 1 x 3 µm de comprimento, sendo menores que os demais membros da família *Enterobacteriaceae*. Os integrantes desse gênero são anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São capazes de multiplicar-se em temperaturas que variam de 0 a 44°C, embora a temperatura ótima seja de 25 a 28°C. Crescem numa faixa de pH de 4 a 10, sendo o pH ótimo por volta de 7,6. São móveis a temperatura ambiente (25°C), devido à presença de flagelos peritríquios ou peripolares, e imóveis a 37°C. As exceções são *Y. pestis* e *Y. pekkanenii*, que são imóveis, e *Y. ruckeri*, que apresenta motilidade variável (Bottone, 1999; Robins-Browne, 2001; Schrieffer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015).

Os membros do gênero *Yersinia* fermentam a glicose com formação de ácido, mas não de gás, são catalase positivos, oxidase negativos e não são hemolíticos em ágar sangue de carneiro a 5%. A maioria das linhagens de *Yersinia* multiplica-se nos meios de cultura usados na rotina laboratorial, como ágar sangue, ágar chocolate, ágar SS (*Salmonella-Shigella*) e ágar MacConkey quando incubados a 37°C em condições de aerofilia. *Yersinia* spp. cresce bem em meios com altas concentrações de sais biliares, consequentemente, é cultivada com sucesso em ágar MacConkey e ágar SS. Nesses meios de cultura, as colônias são redondas, opacas, incolores, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro após incubação a 25°C por 24 horas. O meio seletivo usualmente utilizado para seu isolamento é o ágar CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina). Nesse meio de cultura, as colônias apresentam centro côncavo e vermelho, circundado por uma borda transparente, dando o aspecto de “olho de touro”. É importante ressaltar que algumas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. bercovieri* podem se inibidas quando cultivadas em ágar CIN (Bottone, 1999; Robins-Browne, 2001; Schrieffer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015).

A diferenciação entre as espécies desse gênero é feita frente a seus comportamento em testes bioquímicos tais como motilidade, produção de urease, Voges-Proskauer, produção de indol, utilização do citrato de Simmons, produção de ornitina descarboxilase, hidrólise da esculina e utilização do mucato, além da capacidade de fermentar carboidratos como sacarose, ramnose, celobiose, melibiose, sorbose e rafinose, bem como, o poliálcool sorbitol (Sulakvelidze, 2000; Schriefer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015).

A Tabela 1 apresenta um quadro de diferenciação fenotípica das espécies de *Yersinia*, com exceção de *Y. wautersii*., uma vez que, devido ao seu recente isolamento, pouco se sabe sobre a biologia desta bactéria.

Tabela 1 - Diferenciação fenotípica das espécies de *Yersinia* spp.

Espécies de <i>Yersinia</i>	Reações ou características ^a													
	Motilidade	Produção de urease	Voges-Proskauer	Produção de indol	Utilização de Citrato	Ornitina descarboxilase	Hidrólise da esculina	Utilização de mucato	Fermentação					
									Sacarose	L-ramnose	D-celobiose	D-melibiose	L-sorbose	D-sorbitol
<i>Y. pestis</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	V
<i>Y. similis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	V	-	+	V	-	+	-	+	-	V	V
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	+	+	+	V	+	V	-	+	+	+	-	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	+	+	-	V	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Y. aleksiciae</i> ^b	+	+	-	V	-	+	-	ND	-	-	+	-	V	+
<i>Y. aldovae</i>	+	+	+	-	V	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Y. rohdei</i>	+	V	-	-	+	+	-	-	+	-	+	V	+	V
<i>Y. mollaretii</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>Y. bercovieri</i>	+	+	-	-	-	+	V	-	+	-	+	-	-	+
<i>Y. ruckeri</i>	V	-	V	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i>	+	+	-	+	V	+	+	+	+	-	+	-	+	V
<i>Y. nurmii</i>	+	-	+	-	ND	+	-	ND	+	-	(+)	-	-	-
<i>Y. pekkanenii</i>	-	+	-	-	ND	-	-	ND	-	-	+	-	-	-
<i>Y. entomophaga</i>	+	-	ND	-	+	+	-	ND	+	-	+	+	-	+

^a incubação a 25°C por 48 horas, exceção são os carboidratos para os quais as leituras são feitas por até 7 dias, se permanecendo negativas; +, $\geq 90\%$ de amostras positivas; -, $\geq 90\%$ de amostras negativas; (+); fracamente positiva; V (variável), 11 a 98% de amostras positivas; ND, não realizado; ^b *Y. aleksiciae* pode ser separada fenotipicamente de *Y. kristensenii* apenas pela atividade de lisina descarboxilase, *Y. aleksiciae* é lisina descarboxilase positiva e *Y. kristensenii* é negativa (Hurst *et al.*, 2011; Murros-Kontinen, Fredriksson-Ahomaa, *et al.*, 2011; Murros-Kontinen, Johansson, *et al.*, 2011; Souza, Falcão e Falcão, 2011)

As espécies de *Yersinia* possuem um conteúdo de G + C que varia de 46 a 50%. As relações DNA-DNA entre as espécies do gênero são muito diversas, de 55 a 74%, com exceção de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, que apresentam mais de 90% de similaridade entre si. Contudo, apesar da alta similaridade genômica, *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são classificadas como espécies distintas, pois causam doenças com modos de transmissão e patogêneses muito diferentes entre si. Ainda, os membros do gênero *Yersinia* apresentam

similaridades de 10 a 32% em relação aos demais membros da família *Enterobacteriaceae* (Schriefer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015).

1.3. *Yersinia enterocolitica*

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Yersinia*, *Y. enterocolitica* é o patógeno de maior prevalência entre os humanos (Bottone, 1997; Drummond *et al.*, 2012).

Y. enterocolitica é uma espécie heterogênea, que pode ser dividida em seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4 e 5) de acordo com a resposta frente a diferentes testes fenotípicos (Fredriksson-Ahomaa, 2007; Drummond *et al.*, 2012), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de *Y. enterocolitica* após incubação a 25°C por 48 horas

Reações ^a	Biotipos					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase	+	+	-	-	-	-
Esculina	+	-	-	-	-	-
Salicina	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xilose	+	+	+	+	-	V
Trealose	+	+	+	+	+	-
Redução do nitrato	+	+	+	+	+	-
DNase	-	-	-	-	+	+
Pirazinamidase	+	-	-	-	-	-

^a +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas; (+), fracamente positiva; V (variável), 11 a 98% de amostras positivas (Schriefer e Petersen, 2011).

Os biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 são associados com doenças em humanos e animais e, portanto, considerados patogênicos, enquanto, o biotipo 1A consiste de linhagens isoladas, sobretudo, do meio ambiente e consideradas não patogênicas. Entretanto, existem relatos do isolamento de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A de humanos com sintomas de gastroenterite (Fredriksson-Ahomaa, 2007; Falcão *et al.*, 2008; Drummond *et al.*, 2012; Campioni e Falcão, 2014).

Ainda, baseando-se na hibridização DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA, *Y. enterocolitica* pode ser subdividida em duas subespécies (Neubauer, Aleksic, *et al.*, 2000; Neubauer, Hensel, *et al.*, 2000). A primeira subespécie, denominada *Y. enterocolitica* subespécie *enterocolitica*, é formada por linhagens do biotipo 1B que são altamente patogênicas e frequentemente isoladas na América do Norte, sendo os bio-sorogrupos 1B/O:8, 1B/O:13, 1B/O:18, 1B/O:20 e 1B/O:21 os mais prevalentes. A segunda subespécie, chamada de *Y. enterocolitica* subespécie *paleartica*, é formada por linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 2,

3, 4 e 5 e são isoladas mundialmente, sendo os bio-sorogrupos 4/O:3, 2/O:9, 3/O:5,27, 1A/O:7,8, 1A/O:6,30 e 1A/O:5 os mais frequentes (Sachdeva e Viridi, 2004; Fredriksson-Ahomaa, 2007).

O esquema antigênico de *Y. enterocolitica* inclui 76 soros somáticos e 44 antígenos flagelares (Wauters *et al.*, 1991). Esse esquema antigênico é compartilhado entre as espécies de *Yersinia* spp., exceto *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. No entanto, apenas a caracterização dos antígenos somáticos é utilizada para o diagnóstico em laboratórios de rotina. As linhagens patogênicas de *Y. enterocolitica* usualmente pertencem aos sorogrupos O:1,2,3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32, O:5,27; O:13a,13b; O:18; O:20 e O:21, sendo os bio-sorogrupos 4/O:3; 1B/O:8; 2/O:9 e 2/O:5,27 os mais relacionados a doenças em humanos (Bottone, 1999; Robins-Browne, 2001; Falcão *et al.*, 2006; Fredriksson-Ahomaa, 2007; Schrieffer e Petersen, 2011; Drummond *et al.*, 2012).

Y. enterocolitica também pode ser classificada quanto à sensibilidade a diferentes fagos. No esquema para fagotipagem existem nove fagotipos: II, VIII, IX_a, IX_b, XI, X, X₃, X_z e X_o (Nicolle, Mollaret e Brault, 1976). Todavia, a fagotipagem é realizada em poucos laboratórios devido à necessidade de manter os estoques de fagos biologicamente ativos e da disponibilidade de linhagens controle (Fredriksson-Ahomaa, 2007).

Y. enterocolitica está amplamente distribuída na natureza e tem sido isolada de várias fontes, como animais, alimentos e ambiente. Suínos, pássaros, cães e gatos são considerados os principais reservatórios dessa espécie bacteriana e são, dessa maneira, fontes de infecção para o homem. *Y. enterocolitica* tem sido isolada também a partir de fontes ambientais como lagoas e rios. Alimentos como carnes, leite e sorvetes, têm sido frequentemente relacionados à transmissão de *Y. enterocolitica*, embora a maioria dos isolados dessas fontes não pertençam aos bio-sorogrupos reconhecidamente patogênicos (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Fredriksson-Ahomaa, 2007; Falcão *et al.*, 2008; Drummond *et al.*, 2012).

Os bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* diferem quanto à sua distribuição geográfica. Linhagens do biotipo 1B sorogrupos O:4,32; O:8; O:13; O:18; O:20 e O:21 estão frequentemente associadas a doenças em humanos, principalmente nos Estados Unidos e Canadá. Entretanto, o bio-sorogrupo 1B/O:8 foi ocasionalmente isolado na Europa e Japão. O bio-sorogrupo 4/O:3 é frequentemente isolado como causa de doença em humanos na Europa, Canadá, Japão, Brasil e Estados Unidos. Os sorogrupos O:9 e O:5,27 estão amplamente distribuídos. Linhagens pertencentes ao biotipo 1A dos sorogrupos, O:5; O:6,30; O:7,8; O:10; O:18 e O:49 estão mundialmente distribuídas e são isoladas predominantemente do ambiente,

de água, fezes e alimentos (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Fredriksson-Ahomaa, 2007; Falcão *et al.*, 2008; Campioni e Falcão, 2014).

1.4. *Yersinia enterocolitica*-like

Até a década de 1980, *Y. enterocolitica* albergou um grande número de linhagens bioquimicamente diferentes. Porém, estudos de hibridação DNA-DNA mostraram que essas linhagens pertenciam a espécies distintas entre si e também de *Y. enterocolitica*, desde modo, os representantes desses subgrupos eram na verdade quatro novas espécies que foram designadas *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. aldovae*. Subsequentes designações de espécies incluíram *Y. rohdei*, *Y. mollaretti* e *Y. bercovieri* no gênero. Essas linhagens foram chamadas de *Y. enterocolitica*-like e constituem as espécies *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretti*, e *Y. rohdei* (Brenner *et al.*, 1976; Bercovier *et al.*, 1980a; Brenner *et al.*, 1980; Ursing *et al.*, 1980; Bercovier *et al.*, 1984; Aleksic *et al.*, 1987; Wauters *et al.*, 1988; Sulakvelidze, 2000).

As espécies de *Y. enterocolitica*-like estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de humanos saudáveis e doentes e também a partir de várias outras fontes. Com exceção de *Y. aldovae*, todas as demais espécies de *Y. enterocolitica*-like já foram isoladas de humanos, incluindo pessoas com distúrbios gastrointestinais. A exata prevalência dessas espécies em humanos ainda não está bem determinada (Sulakvelidze, 2000). *Y. enterocolitica*-like também já foram isoladas de diversos locais como fontes de águas naturais, esgotos, água potável, animais domésticos e selvagens e também de criações comerciais, além de alimentos e vegetais (Langeland, 1983; Massa *et al.*, 1988; Fukushima, Gomyoda e Kaneko, 1990; Ruhle, Höller e Gundermann, 1990; Ziegert e Diesterweg, 1990; Fantasia *et al.*, 1993; Kuznetsov e Timchenko, 1998; Falcão *et al.*, 2008).

A importância clínica das espécies de *Y. enterocolitica*-like é um tópico de controvérsia, com alguns pesquisadores considerando todas as espécies de *Y. enterocolitica*-like como não patogênicas para o homem e outros acreditando que pelo menos algumas espécies possam causar doenças (Sulakvelidze, 2000).

No último levantamento realizado pelo Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*, no Brasil, foi relatada a existência de centenas de linhagens de *Yersinia* isoladas das mais diversas fontes, sendo as espécies *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* as mais comumente isoladas após *Y. enterocolitica* (Falcão *et al.*, 2008). Além disso, as espécies *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* são referidas como espécies altamente relacionadas à *Y. enterocolitica* (Robins-Browne *et al.*, 1989).

1.4.1. *Yersinia frederiksenii*

A primeira linhagem do que hoje é reconhecido como *Y. frederiksenii* foi isolada por Graux e, posteriormente, reportada por Wauters (1970), a partir de um grupo de *Y. enterocolitica*-like que apresentavam a capacidade de fermentar ramnose. Assim, *Y. frederiksenii* pode ser facilmente diferenciada de *Y. enterocolitica* e de outras espécies de *Y. enterocolitica*-like por ser positiva para a fermentação de ramnose. Apenas *Y. intermedia* e *Y. aldovae* também fermentam esse carboidrato, porém, *Y. frederiksenii* difere de *Y. intermedia* por não fermentar melibiose, rafinose e α -metil-D-glicosídeo e de *Y. aldovae*, por fermentar sacarose (Tabela 1). Devido a essa habilidade, alguns pesquisadores acreditavam que a linhagem isolada por Graux, bem como, as outras linhagens capazes de fermentar ramnose não deveriam ser incluídas na espécie *Y. enterocolitica*. Esta sugestão foi posteriormente substantiada por Brenner *et al.* (1980) através de estudos de hibridação DNA-DNA. Deste modo, Ursing e Aleksic (1995) sugeriram que essas linhagens pertenciam a uma nova espécie e propuseram o nome *Y. frederiksenii* em homenagem ao microbiologista dinamarquês Wilhelm Frederiksen, o qual realizou grandes contribuições no estudo do gênero *Yersinia* (Ursing *et al.*, 1980; Sulakvelidze, 2000).

Desde sua descrição, a espécie tem sido caracterizada como uma espécie geneticamente heterogênea, formadas por três grupos genômicos ou genoespécies separados por grande distância genética (Dolina e Peduzzi, 1993). Contudo, devido a dificuldade de separar essas três genoespécies por testes bioquímicos e devido ao pequeno número de linhagens quando da proposição da espécie, decidiu-se que os três grupos genômicos seriam mantidos dentro da espécie *Y. frederiksenii* (Demarta *et al.*, 2004).

Os antígenos flagelares (H) de *Y. frederiksenii* são diferentes dos de *Y. enterocolitica*, mas vários antígenos somáticos (O) são comuns, sendo mais frequentes os antígenos O:16, O:1 e O:2 em *Y. frederiksenii*. No Brasil, os sorogrupos mais comuns são o O:16 e O:40 (Falcão *et al.*, 2008). Esta espécie tem sido primariamente isolada de águas de esgoto, águas de nascentes, riachos, lagoas, solos, peixes, roedores selvagens, alimentos como leite, queijos, carnes, cortes de frango e verduras, animais domésticos, suínos e humanos saudáveis e doentes (Ursing *et al.*, 1980; Wauters *et al.*, 1991; Sulakvelidze, 2000; Falcão *et al.*, 2008; Falcão e Souza, 2015).

Cafferkey *et al.* (1993) reportaram um caso de infecção sintomática por *Y. frederiksenii* de uma médica de 24 anos em um hospital irlandês, que apresentou quadro de diarreia associada à perda de peso de 4,5 Kg, mal-estar generalizado e sem dor abdominal. A infecção foi associada à água contaminada e leite não pasteurizado. Shayegani *et al.* (1981) reportaram o isolamento de oito linhagens de *Y. frederiksenii* de humanos. Além disso, em um estudo em

Teerã, *Y. frederiksenii* foi isolada das fezes de uma criança com diarreia aguda, sendo que a presença de outras bactérias entéricas patogênicas foi excluída Soltan-Dallal e Moezardalan (2004). Falcão *et al.* (2008) também reportaram o isolamento de sete linhagens de *Y. frederiksenii* de fezes diarreicas de humanos e animais em um estudo realizado no Brasil.

1.4.2. *Yersinia intermedia*

Botzler, Wetzler e Cowan (1968) relataram o isolamento de bactérias parecidas com *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* de rãs e de caracóis. Essas linhagens eram positivas para a fermentação de ramnose e melibiose, sendo a maioria capaz de fermentar também rafinose, porém, incapazes de descarboxilar a ornitina. Várias linhagens com características semelhantes foram posteriormente isoladas. Brenner *et al.* (1980) analisaram algumas dessas bactérias e concluíram que estas linhagens pertenciam a uma espécie distinta de *Y. enterocolitica* e de outras *Y. enterocolitica*-like fermentadoras de ramnose. Além disso, *Y. intermedia* apresentou 45-50% de similaridade genética em relação à *Y. pseudotuberculosis* e várias características bioquímicas semelhantes a esta espécie, como a capacidade fermentar ramnose e melibiose. Habilidades não encontradas em *Y. enterocolitica*. Contudo, *Y. intermedia* também apresentava algumas das características bioquímicas de *Y. enterocolitica*, como por exemplo, fermentação da sacarose e celobiose. Habilidades não encontradas em *Y. pseudotuberculosis* (Tabela 1). Devido às propriedades intermediárias entre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, *Y. intermedia* foi separada de *Y. enterocolitica* e definida como uma nova espécie. Bottone e Chester propuseram, em 1980, que a espécie fosse chamada de *Yersinia intermedia* (Brenner *et al.*, 1980; Sulakvelidze, 2000).

Y. intermedia possui antígenos flagelares (H) específicos e partilha alguns antígenos somáticos (O) com *Y. enterocolitica*. Os sorogrupos O:4 e O:17 parecem ser predominantes, contudo, como a maioria das linhagens de *Y. intermedia* não são tipáveis pelo esquema de sorotipagem de Wauters *et al.* (1991), o sorogrupo realmente predominante não é conhecido. Esta espécie é bioquimicamente heterogênea podendo, ainda, ser subdividida em 10 biotipos, com base na fermentação de melibiose, ramnose, α -metil-D-glicosídeo e rafinose, bem como da utilização de citrato de Simmons, conforme mostrado na Tabela 3 (Sulakvelidze, 2000; Martin *et al.*, 2009). No Brasil, os bio-sorogrupos mais comuns são o 1/O:13,7, 1/O:18 e 4/O:40 (Falcão *et al.*, 2008).

Tabela 3 - Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de *Y. intermedia* após incubação a 25°C por 48 horas

Biotipos	Reações ^a				
	Fermentação				Utilização do Citrato de Simmons
	D-melibiose	D-ramnose	α -metil-D-glicosídeo	L-rafinose	
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	-	+	+
4	+	-	+	+	V
5	+	-	-	+	V
6	+	+	+	-	-
7	+	+	-	-	-
8	-	+	+	+	+
9	-	+	+	-	+
10	-	+	+	-	-

^a +, $\geq 90\%$ de amostras positivas; -, $\geq 90\%$ de amostras negativas; V (variável), 11 a 98% de amostras positivas (Martin *et al.*, 2009).

Y. frederiksenii e *Y. intermedia* têm nichos ecológicos similares e são fenotipicamente muito próximas. A distinção entre ambas as espécies depende da ausência simultânea da produção de ácido a partir de melibiose e rafinose em *Y. frederiksenii* (Tabela 1). Esta espécie tem sido principalmente isolada de água doce, peixes, ostras, camarões, caracóis, animais selvagens e domésticos, alimentos tais como leite, creme, carne, cortes de frango, verduras, entre outros e também de humanos, incluindo pessoas com desordens gastrointestinais. (Sulakvelidze, 2000; Falcão *et al.*, 2008).

Ainda, Soltan-Dallal e Moezardalan (2004) reportaram o isolamento de duas linhagens de *Y. intermedia* de fezes de crianças em Teerã e a presença de outras bactérias entéricas patogênicas foi excluída. Shayegani *et al.* (1981) também reportaram o isolamento de 18 linhagens de *Y. intermedia* de humanos. No Brasil, Falcão *et al.* (2008) reportaram o isolamento de três linhagens de *Y. intermedia* de humanos e animais.

1.4.3. *Yersinia kristensenii*

Linhagens de *Yersinia* spp. fermentadoras de trealose e não fermentadoras de sacarose foram isoladas de uma grande variedade de fontes no mundo (Sulakvelidze, 2000). Knapp e Thal (1973) sugeriram que essas bactérias não pertenciam à espécie *Y. enterocolitica* e Wauters (1973) propôs que elas fossem agrupadas em um novo biotipo.

Em 1980, Bercovier *et al.* (1980) propuseram que o grupo de bactérias positivas para a fermentação de trealose, descaboxilação da ornitina e negativas para a fermentação de ramnose e sacarose fossem designadas como uma nova espécie e propuseram o nome *Y. kristensenii* em homenagem ao microbiologista dinamarquês Martin Kristensen, o qual isolou esta bactéria pela primeira vez. Assim como *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* é uma espécie bastante heterogênea com alguns isolados sendo filogeneticamente mais relacionados à *Y. mollaretii* (Sulakvelidze, 2000).

Os antígenos flagelares (H) de *Y. intermedia* são diferentes dos de *Y. enterocolitica*, porém há vários antígenos somáticos (O) comuns, sendo mais frequentes os antígenos O:12, O:28 e O:11. No Brasil, o sorogrupo mais comum é o O:61 (Falcão *et al.*, 2008). Esta espécie tem sido primariamente isolada de várias amostras ambientais como água doce, solo, entre outros, alimentos, animais tais como cavalos, ovelhas, macacos e humanos saudáveis e doentes (Sulakvelidze, 2000; Falcão *et al.*, 2008).

Shayegani *et al.* (1981) reportaram o isolamento de três linhagens de *Y. kristensenii* de humanos. Além disso, Falcão *et al.* (2008) também reportaram o isolamento de uma linhagem de *Y. kristensenii* de animal em um estudo realizado no Brasil.

1.5. Genes relacionados à virulência

Sabe-se que *Y. enterocolitica*-like usualmente não alberga a maioria dos genes relacionados à virulência, os quais já foram bem caracterizados na patogênese de *Y. enterocolitica* (Sulakvelidze, 2000; Schrieffer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015).

Para que *Y. enterocolitica* possa causar doença, é necessário um conjunto de atributos ou fatores de virulência que são codificados tanto por genes cromossômicos, quanto por genes plasmidiais, contidos no plasmídio de virulência pYV (*plasmid for Yersinia virulence*). A expressão desses genes é dependente da temperatura e, enquanto os genes cromossômicos são usualmente expressos a 25°C, os genes plasmidiais são expressos a 37°C (Robins-Browne, 2001).

Dentre os genes cromossômicos relacionados à virulência, os quais já foram identificados e bem caracterizados, estão os relacionados com a síntese de fímbrias, adesão e invasão a células eucarióticas, produção de enterotoxinas, captura de ferro, entre outros (Carniel, 1995). Dentre os genes presentes no plasmídio pYV estão importantes genes responsáveis pela subversão de *Yersinia* à resposta imune inata do hospedeiro, entre outros (Viboud e Bliska, 2005).

O plasmídio pYV está presente nas espécies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. A presença do plasmídio pYV permite que *Yersinia* sobreviva e multiplique-se nos tecidos linfóides do seu hospedeiro (Cornelis *et al.*, 1998). Esse plasmídio codifica uma proteína de membrana externa YadA (*Yersinia adhesin A*) de 44 a 47kDa e um conjunto de proteínas regulatórias, estruturais e efetoras chamado Yops (*Yersinia outer proteins*) (Fredriksson-Ahomaa, 2007; Drummond *et al.*, 2012).

A mais importante adesina de *Yersinia*, é a proteína de membrana externa YadA produto do gene plasmidial *yadA*, produzida a 37°C. YadA se apresenta sob a forma de fibrilas que recobrem toda a superfície da bactéria induzindo a adesão da bactéria ao muco intestinal, colágeno, laminina e fibronectina e, posteriormente, a internalização por endocitose. O complexo formado permite a ligação a β -integrinas, levando à internalização da bactéria por endocitose. Essa proteína também é responsável por inibir a resposta imune inata do hospedeiro, conferindo resistência à ação do sistema complemento, inibição da fagocitose e do *burst* respiratório (Bottone e Robin, 1977; Bottone, 1999; Drummond *et al.*, 2012).

Os genes *yops* codificam as proteínas Yops. As Yops são secretadas por meio de um sistema de secreção de tipo III, codificado pelo gene *ysc*. O sistema de secreção do Tipo III é utilizado por bactérias Gram-negativas para translocar proteínas bacterianas efetoras diretamente no citoplasma da célula eucariótica hospedeira. Nos macrófagos, os efeitos das Yops efetoras são de inibição da fagocitose, do *burst* respiratório, da produção de citocinas pró-inflamatórias e da apoptose. Nos leucócitos polimorfonucleares, provocam resistência à fagocitose e à morte pelos peptídeos antimicrobianos. Nas células epiteliais, causam citotoxicidade e alteração da resposta à liberação de citocinas (Bottone e Robin, 1977; Cornelis *et al.*, 1998; Fredriksson-Ahomaa, 2007).

As Yops são produzidas *in vitro* à temperatura de 37°C e em baixas concentrações do íon cálcio. Os genes estruturais que codificam várias dessas proteínas estão distribuídos ao longo do plasmídio pYV em uma região de 20Kb, chamada cálcio-dependente. Os *loci* transcripcionais chamados *lcrA* (*virA*), *lcrB* (*virB*), *lcrC* (*virC*), *lcrF* (*virF*) e *lcrG* (*virG*), são os responsáveis pelo controle da resposta ao cálcio e da produção das Yops. O gene *virF*, codifica uma proteína denominada VirF em *Y. enterocolitica*, que é a principal reguladora transcrricional dessa maquinaria (Cornelis *et al.*, 1998).

A capacidade de adesão e invasão celular é considerada etapa essencial na patogênese de yersiniae (Miller e Falkow, 1988). A capacidade de adesão e invasão celular está muito relacionada à presença do plasmídio pYV e dos genes cromossômicos *myf* (*mucoide Yersinia*

fibrillae), *inv* (invasin) e *ail* (*attachment invasion locus*) em linhagens de *Y. enterocolitica* patogênicas (Carniel, 1995; Sulakvelidze, 2000; Fredriksson-Ahomaa, 2007).

Especificamente, à temperatura de 25°C, *Y. enterocolitica* expressa fímbrias, codificadas pelo gene *myfA*. As fímbrias são produzidas na superfície da célula bacteriana e são denominadas Myf por conferirem aspecto mucóide às colônias que as expressam. A síntese dessas fímbrias envolve três genes cromossômicos: *myfA*, *myfB* e *myfC*. Myf pode servir como um fator de colonização intestinal em *Y. enterocolitica*, conferindo assim, a aderência da bactéria ao epitélio intestinal. As fímbrias são muito flexíveis e semelhantes ao fator de colonização CS3, encontrado em muitas linhagens de *E. coli* enterotoxigênica isoladas de humanos (Carniel, 1995; Sulakvelidze, 2000; Fredriksson-Ahomaa, 2007).

Ainda à 25°C, *Y. enterocolitica* produz em sua membrana externa uma proteína de invasão de 92 kDa denominada invasina (Inv) e codificada pelo gene *inv*, que desempenha um papel vital na entrada de *Y. enterocolitica* nas células epiteliais do íleo durante os estágios iniciais da infecção. A invasina também pode ser produzida *in vitro* a 37°C quando a bactéria cresce em pH baixo. Inv confere à bactéria a propriedade de invasão *in vitro* a células HeLa (células epiteliais de adenocarcinoma cervical humano), HEp-2 (células epiteliais de carcinoma de laringe) e Henle 407 (células epiteliais de intestino humano). Inv inicia diretamente a penetração da bactéria na célula alvo através da ligação a receptores denominados β -integrinas. Em células epiteliais, essa interação promove modificações no citoesqueleto, endocitose da bactéria e acúmulo de actina ao redor do vacúolo endocítico. Em linfócitos T, induz a secreção de citocinas por células T-CD4 e citotoxicidade por células T-CD8. O gene *inv*, o qual codifica Inv, está presente no cromossomo de todas as linhagens de *Y. enterocolitica*, contudo, é funcional apenas nas sorovariedades patogênicas, o que indica que a invasina desempenha um papel fundamental na virulência (Carniel, 1995).

Com a adaptação à temperatura do hospedeiro, um segundo fator de adesão e invasão é produzido a 37°C, a proteína Ail, codificada pelo gene cromossômico *ail* (*adhesion and invasion loccus*). Ail é uma proteína de membrana externa de 17kDa, sem qualquer homologia com Inv. Em contraste com o gene *inv*, o *ail* é encontrado apenas em bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* associados a doenças, portanto, é expresso nas linhagens dos biotipos 1B e 2 a 5 de *Y. enterocolitica*. Já, as linhagens do biotipo 1A, usualmente, não possuem o gene *ail*. Ail também medeia a resistência ao efeito bactericida do complemento (Carniel, 1995; Robins-Browne, 2001; Fredriksson-Ahomaa, 2007; Leo e Skurnik, 2011).

Estudos moleculares enfatizaram a importância do plasmídio pYV, dos genes cromossômicos *ail* e *inv* já mencionados e a habilidade de produzir uma enterotoxina termo-

estável (Yst) como fatores importantes no potencial de causar doenças de linhagens virulentas de *Y. enterocolitica* (Sulakvelidze, 2000).

Numerosas linhagens patogênicas de *Y. enterocolitica* produzem uma enterotoxina termo-estável de 30 aminoácidos denominada Yst, codificada pelo gene cromossômico *ystA*, cuja porção carboxi-terminal é homóloga à enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxigênica, de *Citrobacter freundii* e de *Vibrio cholera* não O:1 (Delor *et al.*, 1990; Robins-Browne, 2001). YstA é produzida em temperaturas inferiores a 30°C, portanto, pode não ser expressa *in vivo*, porém, uma vez que YstA é resistente ao pH ácido do estômago, pode causar intoxicação alimentar quando é produzida em alimentos e ingerida pré-formada (Schiemann, 1988). Entretanto, resultados sugerem que esta toxina também pode ser expressa a 37°C em meio com alta osmolaridade e pH similares ao do lúmen intestinal. O gene *ystA* é restrito apenas às sorovariedades patogênicas de *Y. enterocolitica* (Robins-Browne, 2001). Delor e Cornelis (1992) e Delor *et al.* (1990) relacionaram a produção de Yst por linhagens de *Y. enterocolitica* como causa de diarreia em humanos. Além da proteína YstA, *Y. enterocolitica* expressa outra enterotoxina denominada YstB, que é codificada pelo gene *ystB*, a qual se acredita que, assim como a proteína YstA, possa também ser responsável por causar diarreia (Robins-Browne, 2001).

Assim, a produção de uma toxina Yst-like por linhagens de *Y. enterocolitica*-like pode ser considerada um fator de virulência para essas espécies. Alguns relatos discorrem sobre a presença de sequências homólogas do gene *ystA* em linhagens de *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* (Delor *et al.*, 1990; Kwaga, Iversen e Misra, 1992; Tennant, Grant e Robins-Browne, 2003). A proteína YstB é uma das enterotoxinas *ystA*-homólogas, a qual acredita-se também ser causa de diarreia, porém seu papel na patogenicidade de linhagens de *Y. enterocolitica*, incluindo as do biotipo 1A não é bem compreendido. Isso se deve ao fato dessa proteína ser expressa *in vitro* somente a temperaturas inferiores a 30°C e também à falta de relação entre a presença do gene e a produção da toxina *in vitro*. Foi demonstrado que o gene *ystB* é bastante prevalente em linhagens do biotipo 1A (Bhagat e Viridi, 2007; Campioni e Falcão, 2014). Entretanto, a prevalência dos genes *ystA* e *ystB* em linhagens de *Y. enterocolitica*-like ainda não foi determinada (Sulakvelidze, 2000).

O ferro é um fator de crescimento essencial para a multiplicação e sobrevivência de quase todas as bactérias, incluindo *Y. enterocolitica*. A habilidade de capturar o ferro *in vivo* é um dos principais fatores que diferenciam linhagens de alta e baixa patogenicidade (Carniel, 1995). O armazenamento, o transporte, a biossíntese e regulação de ferro são importantes para a adaptação das espécies de *Yersinia* a diferentes condições ambientais. Dois mecanismos são

utilizados por *Yersinia* para realizar a captura do ferro. Um deles é através de pequenas moléculas quelantes do ferro denominadas sideróforos e o outro consiste em utilizar as moléculas de ferro ligadas a proteínas heme. Os sideróforos quelam o ferro ligado a proteínas eucarióticas, transportam-no a receptores específicos na membrana externa bacteriana, liberando-o no citoplasma (Carniel, 1995). Os sideróforos podem ser sintetizados pela bactéria (endógenos) ou utilizados do meio externo (exógenos), sendo os exógenos sintetizados por outras bactérias. Há um grande número de sideróforos diferentes em sua estrutura que já foram descritos, os quais podem ser divididos em três principais classes químicas que são os catecolatos, hidroxamatos e os compostos heterocíclicos.

Yersiniabactina é um sideróforo, o qual é sintetizado apenas por *Yersinia* de alta patogenicidade. *Y. enterocolitica*, incluindo o sorogrupo O:8, são capazes de sintetizar yersiniabactina. A biossíntese de yersiniabactina e genes de transporte são agrupados dentro de uma região do cromossomo conhecida como ilhas de alta patogenicidade (HPI) (Carniel, 2001). Linhagens de *Y. enterocolitica* de baixa patogenicidade, incluindo as dos sorogrupos O:3 e O:9, utilizam sideróforos exógenos como a ferrioxamina, aumentando assim a sua capacidade de disseminação no hospedeiro. Estes sistemas de ferro-regulação asseguram a sobrevivência e a multiplicação de *Yersinia* em um ambiente competitivo de ferro (Fredriksson-Ahomaa, 2007).

Deste modo, genes cromossômicos relacionados à virulência incluem *fepA* e *fepD*, os quais codificam proteínas responsáveis pelo transporte de sideróforos; *fes*, que leva à liberação de ferro no citoplasma. Especificamente em *Y. enterocolitica*, o sideróforo exógeno enterobactina da classe dos catecolatos, é transportado por proteínas de membrana codificadas pelos genes *fep* e a liberação do ferro no citoplasma bacteriano ocorre pela ação de uma enzima codificada pelo gene *fes* (Schubert, Fischer e Heesemann, 1999).

A protease HreP é codificada pelo gene *hreP*. As proteases são conhecidas por contribuírem com a patogenicidade bacteriana ao interferirem com as proteínas dos tecidos do hospedeiro e assim inativar importantes proteínas chaves de defesa. A importância de HreP na patogênese de *Y. enterocolitica*, foi demonstrada com uma linhagem de *Y. enterocolitica* mutante para o gene *hreP*, a qual apresentou uma redução significativa na virulência (Heusipp, Young e Miller, 2001).

Algumas linhagens de *Y. enterocolitica*, principalmente as do biotipo 1A, apresentam o gene *tccC* homólogo ao gene *tc* (*insecticidal toxin complex*) de *Photobacterium luminescens*, que permite que essa bactéria sobreviva em insetos. Entretanto, não se sabe ao certo o motivo de linhagens as quais não vivem em insetos possuírem genes homólogos ao gene *tc*, o que se estende também a *Y. enterocolitica* e *Y. enterocolitica*-like. Acredita-se que em *Yersinia*, o gene

tccC não codifique toxinas inseticidas e sim alguma toxina que contribua para a atividade enterotóxica dessa bactéria, já que uma linhagem mutante de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, perdeu sua habilidade de colonizar o trato gastrointestinal de ratos infectados após ter esse gene inativado (Tennant *et al.*, 2005).

É importante mencionar que nem sempre há uma correlação entre a presença dos marcadores de virulência acima mencionados, como por exemplo, *inv*, *ail* e *ystA* e a ocorrência da doença (Sulakvelidze, 2000). Um bom exemplo dessa observação é o estudo realizado por Noble *et al.* (1987), cujos resultados confirmam que mesmo linhagens de *Y. enterocolitica* que não possuíam alguns dos fatores de virulência acima citados estavam significativamente associadas a ocorrência de diarreia em pacientes nos quais nenhuma outra causa de doença entérica pode ser identificada. Além do exemplo acima, vários outros estudos relataram o isolamento de linhagens de *Y. enterocolitica* consideradas não-patogênicas em fezes de pacientes (Bottone e Robin, 1977; Ratnam *et al.*, 1982; Bissett *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1991; Cafferkey *et al.*, 1993). Nesses estudos nenhuma outra causa de diarreia foi identificada, o que sugere que linhagens de *Yersinia* consideradas não-patogênicas foram possivelmente responsáveis pela gastroenterite nos pacientes.

1.6. Patogênese

Pouco se sabe sobre a patogênese de *Y. enterocolitica*-like. Entretanto, a patogênese de *Y. enterocolitica* foi bem caracterizada (Robins-Browne, 2001; Falcão e Falcão, 2006).

A doença causada por *Y. enterocolitica* é denominada yersiniose. Infecções clínicas no homem ocorrem, sobretudo, pela ingestão de água e alimentos contaminados por essa bactéria (Bottone, 1999). A dose infectante é desconhecida, porém, acredita-se que seja maior que 10^4 UFC/mL. Os sintomas iniciam-se após 24 a 48 horas da ingestão da bactéria e incluem diarreia, dor abdominal e febre. *Y. enterocolitica* é um patógeno invasivo que induz uma resposta inflamatória nos tecidos infectados. Os principais alvos da infecção são o íleo distal e o tecido linfóide intestinal, porém, regiões intestinais adjacentes e os linfonodos mesentéricos também são envolvidos com frequência. Como *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* tem tropismo por tecido linfóide (Bottone, 1997; Robins-Browne, 2001; Falcão *et al.*, 2006; Fredriksson-Ahomaa, 2007; Drummond *et al.*, 2012).

Após a ingestão, *Y. enterocolitica* migra do estômago para o intestino delgado e desse para a porção terminal do íleo. A maioria das bactérias permanecem no lúmen intestinal, enquanto apenas uma pequena quantidade adere ao epitélio intestinal, sem, contudo, mostrar preferência por nenhum tipo celular (Robins-Browne, 2001; Falcão e Falcão, 2006).

Já as bactérias que invadem o tecido, só o fazem pelas células M que recobrem os folículos linfóides intestinais (placas de Peyer). A adesão e invasão das células M são mediadas por determinantes cromossômicos tais como as proteínas Inv e Ail e plasmidiais, YadA. Após penetrar no epitélio, e atravessar a membrana basal das placas de Peyer, as bactérias proliferam no tecido linfóide do intestino e na lâmina própria, causando destruição localizada de tecidos e levando à formação de microabscessos. A capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro dos folículos linfóides e outros tecidos está associada com a presença do plasmídeo de virulência pYV, o qual é essencial para a patogênese de *Yersinia*. Propriedades antifagocíticas de *Yersinia* são mediadas principalmente por proteínas Yops, que através do contato bactéria-fagócito, subvertem a função fagocitária e permitem a sobrevivência e multiplicação extracelular no tecido linfóide do hospedeiro.

As *Y. enterocolitica* podem ainda alcançar as microvilosidades adjacentes e, através do sistema linfático, atingir outros locais mais distantes. Essas lesões são constituídas por microcolônias de bactérias, rodeadas por células inflamatórias, as quais ocorrem principalmente dentro das criptas intestinais podendo se estender às suas vilosidades (Robins-Browne, 2001; Falcão e Falcão, 2006). Se a bactéria conseguir sair dos linfonodos e cair na corrente circulatória, alcançará órgãos mais distantes, sempre mostrando tropismo por tecidos linfóides, localizando-se preferencialmente no tecido reticulo-endotelial do fígado e do baço (Robins-Browne, 2001; Falcão e Falcão, 2006). Normalmente, a infecção é limitada à área intestinal, mas, algumas vezes, os micro-organismos são drenados para os linfonodos mesentéricos e podem dar origem a uma infecção sistêmica (Robins-Browne, 2001; Fredriksson-Ahomaa, 2007).

Apesar de *Y. enterocolitica* ser considerada um patógeno intracelular facultativo, devido a sua resistência inata à morte por macrófagos, a maioria das lesões histológicas causadas por essa bactéria são extracelulares. Assim, macrófagos contendo a bactéria viável devem exercer um importante papel na sua disseminação pelo corpo do hospedeiro (Robins-Browne, 2001; Falcão e Falcão, 2006).

1.7. Manifestações clínicas

Y. enterocolitica pode causar desde uma enterite autolimitada até infecções sistêmicas fatais (Fredriksson-Ahomaa, 2007; Drummond *et al.*, 2012). No homem, pode causar uma variedade de sintomas clínicos intestinais e extra-intestinais, com graus diversos de gravidade. A gastroenterite é a forma mais frequente de yersiniose, sendo a maior incidência de infecção reportada em crianças com até cinco anos de idade, as quais apresentam uma diarreia

autolimitada com ou sem a presença de sangue. Jovens e adultos podem apresentar dores abdominais, além de diarreia e vômito. Dessa forma, as manifestações da gastroenterite podem variar de acordo com a idade e o sistema imune do hospedeiro. Algumas vezes, os sintomas sugerem uma apendicite aguda e os pacientes apresentam linfadenite mesentérica ou ileite terminal. Em casos mais graves e raros, o quadro pode evoluir para sepse (Robins-Browne, 2001). Infecções por *Y. enterocolitica* também podem ser seguidas por sequelas imunológicas pós-infecção, incluindo eritema nodoso, artrite reativa, glomerulonefrite, Síndrome de Reiter, uveíte e conjuntivite (Bottone, 1997; 1999; Robins-Browne, 2001; Schriefer e Petersen, 2011).

A maioria das gastroenterites e linfadenites mesentéricas causadas por *Y. enterocolitica* em pacientes imunocompetentes é autolimitada, necessitando apenas de reposição eletrolítica. Entretanto, infecções sistêmicas, infecções extra intestinais e enterocolites em paciente imunocomprometidos devem ser tratadas com antibioticoterapia. As opções de tratamento incluem sulfametoxazol-trimetoprima, aminoglicosídeos e fluoroquinolona (Schriefer e Petersen, 2011; Fàbrega e Vila, 2012).

1.8. Estudos de patogenicidade de *Yersinia*

O estudo da patogênese de *Yersinia* spp. pode ser realizado tanto por testes fenotípicos, tais como ensaios de adesão e invasão em células de mamíferos e microscopia eletrônica, quanto por métodos moleculares como RNA-seq, entre outros.

1.8.1. Ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos e microscopia eletrônica

Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1998) reportaram o isolamento de linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A de pacientes sintomáticos. Apesar de não apresentarem os marcadores clássicos de virulência, esses isolados foram capazes de invadir células epiteliais e colonizar o trato intestinal de camundongos. Posteriormente, Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1999) mostrou que essas mesmas linhagens foram capazes de sobreviver em macrófagos. Além disso, foram capazes de escapar dos macrófagos e células epiteliais por um mecanismo que se assemelhava a exocitose e que parece não comprometer a integridade dessas células.

Outros estudos de adesão e invasão células a células HEp-2, CHO e T84, bem como, ensaios de sobrevivência em macrófagos U937 e células polimorfonucleares (PMNs) foram realizados com o intuito de melhor caracterizar a patogenicidade de *Yersinia* (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1998; 1999; Tennant, Grant e Robins-Browne, 2003; McNally *et al.*, 2006; McNally *et al.*, 2007).

1.8.2. RNA-seq

Tecnologias para a análise de transcriptomas estão disponíveis e são amplamente utilizadas desde o desenvolvimento da tecnologia de *microarray* e o sequenciamento completo do genoma humano. No passado, a expressão de mRNA era medida por técnicas de *microarray* ou PCR em tempo real. Contudo, o primeiro método não tem uma excelente sensibilidade, enquanto, o último é muito caro, o que inviabiliza a sua utilização para análises de expressão dos genes de um genoma completo (Mardis, 2008; Mutz *et al.*, 2013). Em contraste, a metodologia de sequenciamento de próxima geração (NGS) é rápida e relativamente mais barata, quando comparada com os outros métodos, além de oferecer um alto rendimento para pesquisas de perfil de expressão gênica, anotação do genoma ou descoberta de RNAs não-codificantes (Mutz *et al.*, 2013).

Em geral, o sequenciamento de DNA é uma das plataformas mais importantes para estudos de biologia molecular. A decodificação da sequência é geralmente realizada utilizando-se a tecnologia de terminação de cadeias com dideoxi (Ronaghi, 2001). Com o aumento da importância do sequenciamento de DNA na pesquisa e diagnóstico (Voelkerding, Dames e Durtschi, 2009), foram desenvolvidos novos métodos de tratamento permitindo a obtenção de alto rendimento nas reações. Enquanto a primeira determinação do genoma humano levou mais de 15 anos e milhões de dólares, hoje é possível sequencia-lo em cerca de oito dias por aproximadamente U\$100.000 (Mutz *et al.*, 2013). Os importantes desenvolvimentos tecnológicos resumidos sob o termo NGS, são baseados na tecnologia de sequenciamento por síntese e chamados de pirosequenciamento. A variante transcriptômica dessa tecnologia é chamada de sequenciamento massivo paralelo de *reads* curtas ou RNA-seq (Denoeud *et al.*, 2008). Nos últimos anos, o RNA-seq está emergindo rapidamente como o principal sistema de perfis quantitativos de transcriptomas (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977; Wang *et al.*, 2008).

Para a obtenção de informação de sequência, vários métodos são bem estabelecidos atualmente. Especificamente, o pirosequenciamento utiliza a tecnologia de sequenciamento por síntese. Aqui, a incorporação de nucleotídeos durante o sequenciamento de DNA é monitorada por luminescência. Portanto, um sistema multi-enzimático baseado em luciferase gera luz após a incorporação de um nucleotídeo. Os quatro diferentes nucleotídeos são adicionados sequencialmente e apenas nucleotídeos incorporados geram um sinal. O pirosequenciamento permite a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), bem como o sequenciamento do genoma completo (Mutz *et al.*, 2013). Além disso, NGS está levando a transcriptômica para a era digital (Blow, 2009).

Várias plataformas de sequenciamento estão disponíveis atualmente. Todos eles utilizam fragmentos curtos, as chamadas *reads*, para investigar as sequências do genoma (Korbel *et al.*, 2007). Uma das plataformas mais comuns com base no princípio do pirosequenciamento convencional é o Sequenciador 454 (Mutz *et al.*, 2013).

A primeira adaptação em grande escala da técnica de pirosequenciamento, inventado pela 454 Life Sciences (Imelfort e Edwards, 2009) e, posteriormente, comercializado pela Roche, é um sistema de alto rendimento (Morozova e Marra, 2008). O DNA fragmentado é ligado a esferas de estreptoavidina que, por conseguinte, são capturados em gotículas aquosas em uma solução de óleo. Esta chamada reação é chamada de PCR em emulsão, e separa moléculas de DNA juntamente com as esferas revestidas. Deste modo, as gotículas formam pequenos reatores de amplificação (Margulies *et al.*, 2005). As esferas são transferidas para uma placa e analisadas por pirosequenciamento normal. O instrumento 454 é capaz de sequenciar até 500 milhões de bases dentro de dez horas. O comprimento de leitura (400 nucleotídeos) é mais curto do que o obtido com a tecnologia de Sanger (600 nucleotídeos), pois é limitada pela química de pirosequenciamento utilizada (Mashayekhi e Ronaghi, 2007). No entanto, o sequenciamento pelo 454 é uma técnica rápida uma vez que até 400.000 reações podem ser realizadas em paralelo (Droege e Hill, 2008). Com quase 2500 publicações de pesquisa até dezembro de 2015 no PubMed, é uma das plataformas de próxima geração mais amplamente utilizadas. A tecnologia de sequenciamento 454 tem sido um dos principais métodos de próxima geração utilizados em transcriptômica (Mutz *et al.*, 2013).

Uma das aplicações mais óbvias de plataformas de tecnologia NGS é o sequenciamento do genoma. A revolução NGS reduziu tremendamente o tempo e custo de sequenciamento de genomas grandes. Portanto, tecnologias NGS se tornaram muito interessantes para sequenciamento *de novo* de genomas eucarióticos e procarióticos (Zhou *et al.*, 2010). NGS também é usado para o re-sequenciamento de genomas completos ou de uma região alvo, que é atualmente uma das aplicações mais amplas do sequenciamento de alto rendimento (Nowrousian, 2010). Desse modo, o re-sequenciamento de última geração aumenta a compreensão de como as diferenças genéticas afetam características fenotípicas e doenças (Cullum, Alder e Hoodless, 2011; Kohlmann, Grossmann e Haferlach, 2012). Recentemente, plataformas de NGS desenvolveram uma grande importância nos diagnósticos para a detecção de mutações moleculares. A aplicação do NGS permite a observação de padrões de mutação do genoma para identificar as alterações de sequência de DNA aberrantes e novos genes de doenças (Zhang *et al.*, 2011; Ma, Ennis e Aparicio, 2012). Tecnologias NGS também foram estabelecidas para examinar as modificações epigenéticas em um genoma de larga escala

(Cullum, Alder e Hoodless, 2011). Estudos de metagenômica são também uma aplicação chave de tecnologias de NGS em pesquisa ecológica e ambiental (Voelkerding, Dames e Durtschi, 2009; Shokralla *et al.*, 2012).

As tecnologias de NGS também têm sido aplicadas com sucesso para estudos de perfis de expressão gênica através do sequenciamento de diferentes espécies de mRNA (Voelkerding, Dames e Durtschi, 2009; Barzon *et al.*, 2011). Essas análises de NGS de alto rendimento desempenham um papel importante na biologia molecular para medir a atividade de milhares de genes em paralelo. Além disso, a tecnologia de NGS permite a quantificação absoluta de transcritos. Isto ajuda a detectar alterações dos níveis de expressão do gene sob diferentes condições biológicas ou entre diferentes tipos de células ou tecidos (Zhou *et al.*, 2010; Cullum, Alder e Hoodless, 2011). A análise do perfil de expressão gênica permite a investigação de funções, estados ou fisiologia celulares. O impacto de fatores ambientais, sinais químicos ou fatores de estresse sobre a expressão gênica pode ser analisado em uma escala genômica usando tecnologias NGS. Para melhorar a anotação de genomas sequenciados, o NGS também tem sido aplicado a descoberta e análise de perfis de pequenos RNA não-codificantes (Marguerat, Wilhelm e Bähler, 2008; Morozova e Marra, 2008).

Poucos são os trabalhos na literatura que utilizaram o RNA-seq para análises do perfil de expressão gênica de *Yersinia* spp., tendo sido a maioria dos trabalhos realizados com *Y. pestis* e *Y. enterocolitica*, duas das espécies mais bem estudadas e caracterizadas do gênero (Babujee *et al.*, 2013; Bent *et al.*, 2015; Stasulli *et al.*, 2015). Pelo nosso conhecimento, apenas um RNA-seq de *Y. intermedia* não patogênica foi publicado. No entanto, nenhum aspecto relacionado à patogênese ou virulência foi abordado, tendo sido verificado apenas como a disponibilidade de oxigênio afeta a fisiologia de yersiniae (Babujee *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre a patogênese de *Y. enterocolitica*-like (Sulakvelidze, 2000; Schriefer e Petersen, 2011; Falcão e Souza, 2015). Portanto, estudos fenotípicos e moleculares que elucidem o potencial patogênico de *Y. enterocolitica*-like, tais como *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* são inéditos e deverão contribuir para uma melhor caracterização de tais espécies.

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Embora poucos, existem relatos de espécies de *Y. enterocolitica*-like isolados de pacientes com distúrbios gastrointestinais. Portanto, tem sido proposta a existência de novos mecanismos de virulência nessas espécies de modo que estes possam estar associados a causa de doenças em humanos. Como as espécies de *Y. enterocolitica*-like não foram extensivamente estudadas como *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*, estas não tiveram seu potencial patogênico claramente demonstrado e elucidado (Delor *et al.*, 1990; Robins-Browne *et al.*, 1991; Bottone, 1997; Sulakvelidze *et al.*, 1999; Sulakvelidze, 2000).

Além disso, os poucos trabalhos existentes sobre o potencial patogênico das espécies de *Y. enterocolitica*-like tentam estabelecer uma correlação entre a presença dos marcadores clássicos de virulência de *Y. enterocolitica* nas linhagens de *Y. enterocolitica*-like (Sulakvelidze, 2000). Dessa forma, esses estudos acabam negligenciando a presença de outros possíveis mecanismos de virulência em *Y. enterocolitica*-like que possam estar relacionadas ao seu potencial em causar doença (Robins-Browne, Cianciosi e Morris, 1990; Sulakvelidze, 2000).

O grande avanço tecnológico nas plataformas de NGS permitiu que esses possíveis novos mecanismos de virulência sejam pesquisados por RNA-seq. Como citado anteriormente, há poucos trabalhos publicados que utilizaram o RNA-seq para análises do perfil de expressão gênica de *Yersinia*. Além disso, a maioria dos trabalhos foi realizados com *Y. pestis* e *Y. enterocolitica*, duas das espécies mais bem estudadas e caracterizadas do gênero (Babujee *et al.*, 2013; Bent *et al.*, 2015; Stasulli *et al.*, 2015). Pelo nosso conhecimento, apenas um RNA-seq de *Y. intermedia* não patogênica foi publicado. Contudo, nenhum aspecto relacionado à patogênese ou virulência foi abordado (Babujee *et al.*, 2013).

Com a realização desse projeto pretendeu-se entender se os mecanismos de virulência clássicos já descritos para *Y. enterocolitica* são os únicos responsáveis pela capacidade de causar doença por yersiniae ou se algumas linhagens de *Y. enterocolitica*-like, tais como *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii*, as quais são consideradas de baixa virulência ou não patogênicas, possuem outros mecanismos de virulência que não os clássicos e dessa forma compreender a verdadeira importância clínica dessas outras espécies de *Yersinia* como possível causa de doenças em humanos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar o potencial patogênico de linhagens de *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial patogênico de linhagens de *Y. enterocolitica*-like através da pesquisa de genes cromossômicos e plasmidiais relacionados à virulência por PCR.
- Validar a presença dos genes relacionados à virulência através de sequenciamento.
- Avaliar a capacidade de adesão a células Caco-2 e HEp-2 de linhagens de *Y. enterocolitica*-like através de contagem em placa e por microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a capacidade de invasão em células Caco-2 e HEp-2 de linhagens de *Y. enterocolitica*-like através de contagem em placa.
- Avaliar a capacidade de sobrevivência de linhagens de *Y. enterocolitica*-like no interior de macrófagos humanos U937 através de contagem em placa.
- Avaliar a presença de possíveis novos mecanismos de virulência a partir do sequenciamento de mRNA extraído de linhagens de *Y. enterocolitica*-like nas condições do ensaio de invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas 118 linhagens de *Yersinia* spp. selecionadas da coleção de cultura do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*. Tal laboratório encontra-se atualmente nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

Y. enterocolitica 8081 ou NCTC 13174 (1B/O:8), que é considerada altamente patogênica, foi utilizada como controle positivo nos experimentos de PCR para os genes *ail*, *ystA* e *virF*, nos ensaios de adesão e invasão celular e na microscopia eletrônica. *Y. enterocolitica* FCF 60 (4/O:3), que é considerada patogênica, *Y. enterocolitica* FCF 119 (1A/O:27) e *Y. enterocolitica* IP 6884 (1A/O:7,8), que são consideradas não patogênicas, foram utilizadas como controle positivo nos experimentos de PCR para os genes *myfA* (*Y. enterocolitica* FCF 60), *tccC* (*Y. enterocolitica* FCF 119), *ystB*, *fepA*, *fepD*, *fes* e *hreP* (*Y. enterocolitica* IP 6884). As fontes e países de isolamento das linhagens FCF 119 e IP 6884 foram descritas em Campioni e Falcão (2014), e FCF 60 foi descrita em Falcão *et al.* (2004).

A Tabela 4 traz de forma mais detalhada as características das 118 linhagens de *Yersinia* spp. estudadas e das quatro linhagens utilizadas como controles positivos.

Tabela 4 – Bio-sorogrupo, fonte, local e ano de isolamento das 118 linhagens de *Yersinia* spp. estudadas, incluindo 50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* e 13 *Y. kristensenii*, e os controles usados na pesquisa de genes relacionados à virulência, ensaios de adesão e invasão e microscopia eletrônica de varredura

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano
FCF 1 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:22	Leite	Rio de Janeiro	1980
FCF 162 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:27	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 163	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 168	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:12,25	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 172	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:12,25	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 182	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 183 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:27	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 184 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 187 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 188	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:25	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 226 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1984
FCF 239 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:2,3	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 276 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,29	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 310 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:66	Queijo	Campinas	1984
FCF 400 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano
FCF 411	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:52	Linguiça	Campinas	1988
FCF 412	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Linguiça	Campinas	1988
FCF 413	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:74	Linguiça	Campinas	1988
FCF 420	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988
FCF 423	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988
FCF 427	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Leite	São Paulo	1988
FCF 434	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Queijo	Rio de Janeiro	1988
FCF 461 *†	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Leite	São Paulo	1990
FCF 492	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:13,7	Verdura	São Paulo	1991
FCF 493	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:22	Verdura	São Paulo	1991
FCF 497	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Carne	São Paulo	1991
FCF 499	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:60	Carne	São Paulo	1991
FCF 512	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16a,58	Verdura	São Paulo	1991
FCF 513 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Carne	São Paulo	1991
FCF 514 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10,34	Carne	São Paulo	1991
FCF 567	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Ostra	Rio de Janeiro	1997
FCF 573	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40,74	Ostra	Rio de Janeiro	1997
FCF 582	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,58	Hambúrguer	Rio de Janeiro	1998
FCF 585	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:38	Almôndegas	Rio de Janeiro	1998
FCF 592	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:60	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998
FCF 593	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998
FCF 596	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:38	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998
FCF 208 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983
FCF 209	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983
FCF 210	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983
FCF 214 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983
FCF 220	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1984
FCF 224	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 341	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de riacho	Rio de Janeiro	1984
FCF 342	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de riacho	Rio de Janeiro	1984
FCF 343	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:2,3	Água de lagoa	Rio de Janeiro	1984
FCF 467 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16a,58	Água	Buenos Aires	1990
FCF 379 *†	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Fezes diarréicas de suíno	Londrina	1985

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano
FCF 543 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:74	Fezes diarreicas humanas	Ribeirão Preto	1993
FCF 577 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,58	Fezes diarreicas humanas	Ribeirão Preto	1997
IP 8372	<i>Y. intermedia</i>	1	O:7,8	Leite	Rio de Janeiro	1980
FCF 9	<i>Y. intermedia</i>	4	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980
FCF 11 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:18	Leite cru	Rio de Janeiro	1980
FCF 16 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980
FCF 18	<i>Y. intermedia</i>	2	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980
FCF 46	<i>Y. intermedia</i>	1	O:66	Leite cru	Rio de Janeiro	1980
FCF 175	<i>Y. intermedia</i>	5	O:16	Leite	Rio de Janeiro	1983
FCF 190 *	<i>Y. intermedia</i>	6	O:14	Leite cru	Campinas	1983
FCF 191	<i>Y. intermedia</i>	1	O:14	Leite cru	Campinas	1983
FCF 192 *	<i>Y. intermedia</i>	6	O:26	Leite cru	Campinas	1983
FCF 201 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:5,27	Leite pasteurizado	Araraquara	1983
FCF 230	<i>Y. intermedia</i>	1	O:12,25	Carne moída	Araraquara	1984
FCF 233 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16	Alface	Araraquara	1984
FCF 234	<i>Y. intermedia</i>	1	O:13,7	Carne moída	Araraquara	1984
FCF 235	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16,29	Fígado de boi	Araraquara	1984
FCF 266	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 280	<i>Y. intermedia</i>	1	O:21	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 294	<i>Y. intermedia</i>	1	O:65	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 296	<i>Y. intermedia</i>	1	O:10,34	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 297	<i>Y. intermedia</i>	6	O:17	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 298 *	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 299	<i>Y. intermedia</i>	4	O:13,7	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 301	<i>Y. intermedia</i>	1	O:36	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 402	<i>Y. intermedia</i>	4	O:33	Leite cru	São Paulo	1988
FCF 421	<i>Y. intermedia</i>	4	O:16	Leite cru	São Paulo	1988
FCF 456 *	<i>Y. intermedia</i>	4	NAG	Leite pasteurizado	São Paulo	1990
FCF 481 *	<i>Y. intermedia</i>	8	O:14	Leite cru	São Paulo	1991
FCF 498	<i>Y. intermedia</i>	3	O:10,34	Carne	São Paulo	1991
FCF 508	<i>Y. intermedia</i>	3	O:5,27	Carne	São Paulo	1991
FCF 509	<i>Y. intermedia</i>	3	O:13,7	Carne	São Paulo	1991
FCF 511 *	<i>Y. intermedia</i>	5	NAG	Carne	São Paulo	1991
FCF 563	<i>Y. intermedia</i>	5	O:33	Leite pasteurizado	São Paulo	1997
FCF 584 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16,58	Almôndegas	Rio de Janeiro	1998
FCF 591	<i>Y. intermedia</i>	1	O:38	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998
FCF 84	<i>Y. intermedia</i>	1	O:4,32	Água	São Paulo	1982
FCF 128	<i>Y. intermedia</i>	4	O:4,32	Água de esgoto	São Paulo	1982

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano
FCF 134 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:40	Água de esgoto	São Paulo	1982
FCF 204 *	<i>Y. intermedia</i>	4	O:16	Água do mar	Rio de Janeiro	1983
FCF 207	<i>Y. intermedia</i>	1	O:18	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1983
FCF 219 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:37	Água de cachoeira	Rio de Janeiro	1984
FCF 222 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:33	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 242	<i>Y. intermedia</i>	4	O:7,8	Água	Rio de Janeiro	1984
FCF 243	<i>Y. intermedia</i>	1	O:13,7	Água	Rio de Janeiro	1984
FCF 245	<i>Y. intermedia</i>	1	O:10	Água	Rio de Janeiro	1984
FCF 246	<i>Y. intermedia</i>	1	O:14	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 250 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 317	<i>Y. intermedia</i>	1	O:15	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 318	<i>Y. intermedia</i>	1	O:48	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 321 *†	<i>Y. intermedia</i>	1	O:25,35	Água de rio	Rio de Janeiro	1984
FCF 323	<i>Y. intermedia</i>	4	O:40	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 325 *	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 330	<i>Y. intermedia</i>	1	O:66	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 336	<i>Y. intermedia</i>	1	O:4,33	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
IP 8184	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Fezes diarréicas de cão	Rio de Janeiro	1980
IP 8181 *†	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Fezes diarréicas humanas	Rio de Janeiro	1980
FCF 61 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:9	Leite	Campinas	1981
FCF 62 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:9	Leite	Campinas	1981
FCF 238 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 240	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 241 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	NAG	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 281	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 282 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Carne	Rio de Janeiro	1984
FCF 410 *†	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11	Linguiça	Campinas	1988
FCF 580 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Ostra	Rio de Janeiro	1998

Continua

Conclusão

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano
FCF 221 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Água de cachoeira	Rio de Janeiro	1984
FCF 324	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 326 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984
FCF 604 *†	<i>Y. kristensenii</i>	NA	NAG	Fezes de capivara	Botucatu	1998
8081	<i>Y. enterocolitica</i>	1B	O:8	NA	NA	NA
FCF 60	<i>Y. enterocolitica</i>	4	O:3	Fezes diarreicas humanas	Recife	1981
FCF 119	<i>Y. enterocolitica</i>	1A	O:27	Água de esgoto	São Paulo	1982
IP 6884	<i>Y. enterocolitica</i>	1A	O:7,8	Roedor	Chile	1978

NA – não se aplica; NAG – não aglutinável; * Linhagens selecionadas para os ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 após 24 horas de incubação; † Linhagens selecionadas para condições adicionais dos ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 após cinco e 12 dias de incubação e HEp-2 após 48 horas de incubação, ensaio de sobrevivência no interior de macrófagos humanos U937 e microscopia eletrônica.

4.2. Reconfirmação da pureza, caracterização fenotípica e reconfirmação sorológica

A reconfirmação da pureza e a caracterização fenotípica foram realizadas para as 118 linhagens de *Yersinia* spp. listadas na Tabela 4. Para a reconfirmação da pureza, cada uma das linhagens de *Yersinia* foi semeada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e cultivada a 25°C por 24 horas, seguido de isolamento. Para o isolamento, foram retiradas alíquotas do caldo BHI, as quais foram semeadas pelo método de esgotamento em ágar MacConkey seguido de incubação a 25°C por 24 horas. As colônias isoladas foram submetidas às provas para verificação da pureza. Tais provas consistiram em ágar TSI (*Triple Sugar Iron*), EPM, MILi e Citrato de Simmons.

O meio EPM (Anexo I) informa quanto à produção de gás a partir da fermentação da glicose, produção de H₂S, urease e L-triptofano desaminase. O meio MILi (Anexo II) permite verificar a motilidade, produção de indol e atividade de lisina-descarboxilase. O meio Citrato de Simmons avalia a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono. Os três meios englobam oito testes bioquímicos que somados ao teste de fermentação da lactose são de extrema importância na caracterização de bactérias pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*.

Após a verificação da pureza, as linhagens isoladas foram submetidas às provas para a reconfirmação fenotípica descritas na Tabela 1.

A reconfirmação sorológica foi realizada por soro-aglutinação em lâmina para as 118 linhagens de *Yersinia* spp. listadas na Tabela 4 de acordo com Wauters *et al.* (1991), usando o crescimento de culturas incubadas a 25°C por 24 horas e 76 anti-soros somáticos obtidos de coelhos e pertencentes ao Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*.

4.3. Armazenamento das linhagens bacterianas

Após o isolamento, identificação e realização das provas para a reconfirmação fenotípica, as 118 linhagens de *Yersinia* spp. listadas na Tabela 4 foram semeadas para estocagem em tubos contendo 3 mL do meio de cultura BHI. Após incubação de 24 horas à temperatura de 25°C, 1430 µL da suspensão bacteriana em BHI foram acrescidos de 570 µL de glicerol 70% em tubo criogênico de 2,0 mL, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol. Os tubos foram mantidos à -80°C. Quando necessário, alíquotas das culturas armazenadas à -80°C foram semeadas em caldo BHI, incubadas à temperatura de 25°C por 24 horas e em seguida semeadas em ágar MacConkey pelo método de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Após 24 horas à 25°C as colônias isoladas foram submetidas aos experimentos subsequentes.

4.4. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

Cada uma das 118 *Y. enterocolitica*-like listadas na Tabela 4 e os controles positivos *Y. enterocolitica* 8081, *Y. enterocolitica* FCF 60, *Y. enterocolitica* FCF 119 e *Y. enterocolitica* IP 6884 foram semeadas em caldo BHI, incubadas à temperatura de 25°C por 24 horas. O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Campioni e Falcão (2014), e sua concentração foi determinada como descrito por Sambrook e Russel (2001) para a utilização nos experimentos de PCR e sequenciamento.

As linhagens foram crescidas em 4 mL de caldo BHI e incubadas a 28°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20817 xg por 3 minutos em centrífuga 5810 R (Eppendorf), o sedimento foi suspenso em 250 µL de solução I (20% de sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM EDTA) a 4°C e as amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos.

Após a incubação, as células foram lisadas com 500 µL de solução II (50 mM NaCl, 1% sarcosil) adicionados de 0,05 mg/mL de proteinase K. Em seguida, a mistura foi incubada em banho de água a 37°C por 2 horas.

Posteriormente, as linhagens foram submetidas à purificação do DNA genômico com 750 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugadas a 20817 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 750 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e em seguida centrifugado a 20817 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 1 mL de etanol a 4°C e mantido em gelo *overnight*.

No dia seguinte, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 20817 xg por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em “*Speed Vac*” (Concentrator 5301, Eppendorf) e posteriormente, suspenso em 400 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen). Aos 400 µL de suspensão de DNA, foram adicionados 2 µL de RNase 50 µg/mL e incubados em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE 1X (Tris Acetato EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos, observados em transluminador ultravioleta Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, California, EUA) e registrados no *software* fotográfico *Quantity One* 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories). A análise das concentrações e pureza do DNA foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta UV MINI 1240 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A pureza do DNA foi considerada satisfatória quando obtidos valores entre 1,7 e 1,9 (A_{260nm}/A_{280nm}). Caso esses valores não fossem atingidos, uma nova extração era realizada.

4.5. Detecção dos genes relacionados à virulência por PCR

A presença dos genes *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC*, *ystA*, *ystB* e *virF* nas 118 linhagens de *Y. enterocolitica*-like listadas na Tabela 4 foi determinada por PCR. As reações foram realizadas no termociclador DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories).

As amplificações foram feitas com 50 ng do DNA extraído, 0,2 mM de cada dNTP, 4 mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase recombinante, Tampão “PCR Buffer” 1X e 25 pmol do *primer forward* e *reverse* específicos para cada um dos nove genes. Reações sem DNA foram utilizadas como controle negativo. As condições da PCR foram: cinco minutos a 94°C; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos na temperatura de hibridação para cada gene e um minuto a 72°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Informações adicionais sobre os *primers* e temperaturas de hibridação usadas na PCR foram apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados gerais sobre os *primers* e temperaturas de hibridação utilizados para a pesquisa dos genes cromossômicos relacionados à virulência

Genes	T (°C)	Primers	Sequencias dos <i>primers</i> (5'-3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>ail</i>	57	Ail1 Ail2	ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG	170	Nakajima <i>et al.</i> (1992)
<i>ystA</i>	60	Pr2a Pr2c	AAT GCT GTC TTC ATT TGG AGC A ATC CCA ATC ACT ACT GAC TTC	145	Ibrahim <i>et al.</i> (1997)
<i>ystB</i>	45	Ystb-F Ystb-R	GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC	146	Thoerner <i>et al.</i> (2003)
<i>virF</i>	59	VirF 1 VirF 2	TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG	590	Wren e Tabaqchali (1990)
<i>myfA</i>	60	myfA 1 myfA 2	CAG ATA CAC CTG CCT TCC ATC T CTC GAC ATA TTC CTC AAC ACG C	272	Kot e Trafny (2004)
<i>fepA</i>	45	fepA 1 fepA 2	TAC GCC AAA ATA CCT TAC GAT TGT AAA TAC ACC CCC ACC TGA	438	Schubert, Fischer e Heesemann (1999)
<i>fepD</i>	45	fepD 1 fepD 2	GTG TGA TTG CCT TAC TAT TG CGG TCA TCC TTT TAT TAC GG	381	Schubert, Fischer e Heesemann (1999)
<i>fes</i>	64	fes 1 fes 2	GCC GGC AGG CAC AGC GTA AT GGC CAA CCC ACC CAA AAC TT	561	Schubert, Fischer e Heesemann (1999)
<i>tccC</i>	52	tccC 1 tccC 2	GGG CAA AAA ATG CGT GAA GAG AG TTT ACC GGA ATA ACG CAC AGT TTT A	1035	Bhagat e Viridi (2007)
<i>hreP</i>	55	hreP 1 hreP 2	GCC GCT ATG GTG CCT CTG GTG TG CCC GCA TTG ACT CGC CCG TAT C	757	Bhagat e Viridi (2007)

Os produtos de PCR foram analisados quanto à presença ou ausência de bandas por eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado com TAE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 min, observados em transluminador ultravioleta Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, California, EUA) e registrados no *software* fotográfico Quantity One 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories).

4.6. Validação da presença dos genes relacionados à virulência por sequenciamento

Para verificar e garantir a especificidade da PCR, amostras representativas de cada *amplicon* para cada gene estudado de *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* foram sequenciados. Especificamente, o *amplicon* correspondente de 12 linhagens foi sequenciado para os genes *ail* (oito de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii*) e *fepA* (quatro de cada espécie). Cinco foram sequenciadas para os genes *fepD* (um de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii*) e *hreP* (um de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii*). Onze para o gene *fes* (quatro de *Y. frederiksenii*, quatro de *Y. intermedia* e três de *Y. kristensenii*), quatro para o gene *tccC* (os quatro de *Y. kristensenii*) e nove para o gene *ystB* (quatro de *Y. frederiksenii*, quatro

de *Y. kristensenii* e um de *Y. intermedia*). Os *amplicons* obtidos nos experimentos de PCR foram utilizados como molde para os sequenciamentos.

Os sequenciamentos foram realizados no 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, California, EUA). As condições da PCR de sequenciamento foram: um minuto a 95°C e 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, cinco segundos a 51°C e quatro minutos a 60°C. As sequências obtidas foram individualmente analisadas pelo *software* ChromasPro v. 1.41 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Austrália).

A identidade dos genes amplificados nesse estudo foi comparada a dos genes de linhagens depositadas no GenBank.

4.7. Ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 e HEp-2

Os ensaios de adesão e invasão foram realizados para 20 *Y. frederiksenii*, 20 *Y. intermedia* e 10 *Y. kristensenii*. As linhagens foram escolhidas baseadas na variabilidade de seus perfis de genes relacionados à virulência. As 50 linhagens selecionadas para tais testes estão destacadas com um * na Tabela 4. Os ensaios de adesão e invasão foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. Tampão fosfato salina (PBS) foi usado como controle negativo.

Cada um dos 24 poços de uma placa foi inoculado com 10^5 células Caco-2 e pré-incubado a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas, de acordo com Finlay e Falkow (1987). Para o ensaio de adesão, 100 µL da cultura de *Yersinia* spp. foi adicionado às células Caco-2 semi-confluentes em 900 µL de Meio Mínimo Essencial Gibco® (MEM) e incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após uma hora, as células foram lavadas três vezes com PBS para a completa remoção das bactérias não aderentes. Em seguida, 500 µL de uma solução de tripsina em PBS (1:9) foi adicionada e a placa foi incubada por cinco minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10°C a 10000 g, e o sobrenadante foi descartado. Por fim, 1 mL de PBS foi adicionado ao *pellet*, o qual foi diluído e plaqueado em ágar Muller-Hinton para a determinação do número de bactérias viáveis.

$$\% \text{ de adesão} = 100 \times \frac{\text{número de bactérias recuperadas}}{\text{número de bactérias inoculadas}}$$

Para o ensaio de invasão, a quantidade de bactérias capazes de invadir as células Caco-2 foi determinada utilizando um protocolo similar ao método descrito acima. As diferenças

entre os protocolos foram: depois da adição da suspensão bacteriana, as células foram incubadas por três horas; depois as células foram lavadas cinco vezes com PBS para a total remoção das bactérias não aderentes, seguida da adição de uma solução contendo 250 µL de PBS com 100 µg/mL de gentamicina e incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 90 minutos, o PBS com gentamicina foi removido e as células foram lavadas cinco vezes com PBS para a remoção do antibiótico. Em seguida, as células foram lisadas para a recuperação das bactérias intracelulares com a adição de 100 µL de Triton X-100 1% and 900 µL of PBS gelado por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10°C a 10000 xg, e o sobrenadante foi descartado. Finalmente, 1 mL de PBS foi adicionado ao *pellet*, o qual foi diluído e plaqueado em ágar Muller-Hinton para a determinação do número de bactérias viáveis.

$$\% \text{ de invasão} = 100 \times \frac{\text{número de bactérias recuperadas}}{\text{número de bactérias inoculadas}}$$

Três condições adicionais para ensaios de adesão e invasão foram realizadas para seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like que apresentaram as maiores porcentagens de invasão. Essas linhagens estão destacadas na Tabela 4 com um † e incluíram duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604), as quais foram isoladas de fontes clínicas e não clínicas, e o controle positivo *Y. enterocolitica* 8081. As três novas condições foram: I) Células Caco-2 após cinco dias de incubação na placa de cultura; II) Células Caco-2 após 12 dias de incubação na placa de cultura; e III) Células HEp-2 após 48 horas de incubação na placa de cultura.

4.8. Ensaio de sobrevivência no interior de macrófagos humanos U937

O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 foi realizado de acordo com McNally *et al.* (2006) e McNally *et al.* (2007) para as seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like que apresentaram as maiores porcentagens de invasão. Essas linhagens estão destacadas na Tabela 4 com um † e incluíram duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604), as quais foram isoladas de fontes clínicas e não clínicas, e o controle positivo *Y. enterocolitica* 8081. Os ensaios de sobrevivência em macrófagos humanos U937 foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. Como controle negativo foi usado PBS.

Cada um dos 24 poços de uma placa foi inoculado com 2×10^5 células U937 e pré-incubado a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após essa pré-incubação, as

células U937 foram tratadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para desencadear a diferenciação das células U937 em macrófagos ativados, os quais foram pré-incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por mais 48 horas. Para o ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937, 100 µL da cultura de *Yersinia* spp. foi adicionado às células U937 semi-confluentes em 900 µL de meio RPMI 1640 (Sigma) e incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após uma hora, as células foram lavadas três vezes com PBS para a completa remoção das bactérias que não foram fagocitadas. Em seguida, uma solução contendo 1000 µL de PBS com 100 µg/mL de gentamicina foi adicionada e a placa foi incubada por 5 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, o PBS com gentamicina foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS para a remoção do antibiótico. Em seguida, as células foram lisadas para a recuperação das bactérias intracelulares com a adição de 100 µL de Triton X-100 1% e 900 µL de PBS gelado por 10 minutos. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10°C a 10000 g, e o sobrenadante foi descartado. Por fim, 1 mL de PBS foi adicionado ao *pellet*, o qual foi diluído e plaqueado em ágar Muller-Hinton para a determinação do número de bactérias viáveis. Paralelamente, séries de poços com células foram lisadas após 15 minutos da adição a gentamicina para a determinação do número de bactérias internalizadas após 1 hora de infecção.

$$\% \text{ de sobrevivência} = 100 \times \frac{\text{número de bactérias recuperadas após 5h}}{\text{número de bactérias recuperadas após 15 min}}$$

4.8.1. Ensaio de exclusão do azul de tripano

A integridade das células U937 infectadas foi examinada por sua habilidade de eliminar o corante azul de tripano de acordo com McNally *et al.* (2006). As células U937 foram expostas às linhagens destacadas na Tabela 4 com um † e incluíram duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) e o controle positivo *Y. enterocolitica* 8081, conforme descrito no ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 e incubadas com uma solução de azul de tripano 0,5% por 5 minutos. Foram contadas 100 células por poço e a proporção de células viáveis (sem captação de corante) e a de células inviáveis (com captação de corante) foi determinada. Os ensaios de sobrevivência em macrófagos humanos U937 foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes. Como controle negativo foi usado PBS.

4.9. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica foi realizada também para as seis linhagens que estão destacadas na Tabela 4 com um † e incluíram duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604), as quais foram isoladas de fontes clínicas e não clínicas, e o controle positivo *Y. enterocolitica* 8081.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), as células Caco-2 ou HEp-2 foram inoculadas sobre lamínulas de vidro. As células foram fixadas com 1,4% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,4), lavadas três vezes com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,4) e pós-fixadas com 2% de tetróxido de ósmio e desidratadas em séries de graduação de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, e 100%) com duas trocas a cada 10 minutos. As células foram secas em ponto crítico (BalteTech CPD030, Liechtenstein), e cobertas com ouro usando EMITECH K650 (Emitech Products Inc, Houston, TX, EUA), e analisados em um microscópio de varredura Zeiss DSM 940A (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) operando a 10kV e equipado com um sistema de captura digital ADDA3 (Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Alemanha).

4.10. Pesquisa de novos mecanismos de virulência em *Y. enterocolica*-like por RNA-seq

O sequenciamento do transcriptoma foi realizado para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410, a qual apresentou a maior porcentagem de invasão, e o controle positivo *Y. enterocolitica* 8081. Foi utilizado um *pool* de mRNAs extraídos para cada uma das linhagens, uma vez que a quantidade extraída em apenas uma reação era insuficiente para o sequenciamento. O RNA-seq foi realizado em dois experimentos independentes.

4.10.1. Extração do RNA

O RNA dessas linhagens foi extraído a partir de bactérias recuperadas como descrito no ensaio de invasão celular a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação, conforme especificado no item 4.7. A extração do RNA total foi realizada com o *kit* PureLink® RNA Mini (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de lise e homogeneização, ligação à coluna de sílica, lavagem e eluição.

A etapa de lise e homogeneização consistiu na centrifugação das células Caco-2 e bactérias recuperadas ao fim do ensaio de invasão celular. Após a centrifugação a 500 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de uma solução de lisozima e 0,5 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% foram adicionados e incubados à temperatura

ambiente por 5 minutos. Após a incubação, 350 µL de tampão de lise com 1% de 2-mercaptoetanol foram adicionados, a amostra foi homogeneizada por 45 segundos e centrifugada a 2600 xg por 5 minutos.

A etapa de ligação à coluna de sílica, lavagem e eluição consistiu na adição de etanol 100% à amostra, a qual foi então transferida para a coluna. A amostra foi centrifugada por 15 segundos a 12.000 xg e o fluxo foi descartado. Em seguida, foram realizadas: uma lavagem com 700 µL de tampão de lavagem I e duas lavagens com 500 µL de tampão de lavagem II, com centrifugações por 15 segundos a 12.000 xg entre cada lavagem. Finalmente, a amostra foi eluída em 30 µL de água livre de RNase.

O RNA total extraído foi, então, tratado com DNase I (Life Technologies) por 15 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA 25 mM e a enzima foi inativada por calor a 65°C por 10 minutos, segundo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado em NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando obtidos valores acima de 2,0 (A_{260nm}/A_{280nm}). Caso esses valores não fossem atingidos, uma nova extração era realizada. A qualidade do RNA total extraído verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico.

4.10.2. Enriquecimento do mRNA de *Yersinia* spp.

O RNA total da célula eucariótica foi removido pelo *kit* MICROBEnrich™ (Ambion), segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de hibridação do RNA à uma mistura de oligonucleotídeos de captura, captura do RNA de mamífero, recuperação do RNA bacteriano enriquecido, precipitação e ressuspensão do RNA bacteriano enriquecido.

A etapa de hibridação do RNA à mistura de oligonucleotídeos de captura consistiu em adicionar o RNA previamente extraído a 300 µL de tampão de ligação e 2 µL de oligonucleotídeos de captura para cada 5 µL de RNA. A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e depois incubada à 37°C por 1 hora para a hibridação.

A etapa de captura do RNA de mamífero e recuperação do RNA bacteriano enriquecido consistiu em adicionar as Oligo *MagBeads* previamente preparadas à mistura e incubar a 37°C por 15 minutos para a captura dos rRNA 18S e 28S e poli-A. Em seguida, as Oligo *MagBeads* foram capturadas com o auxílio de uma estante magnética e o sobrenadante, contendo o RNA bacteriano enriquecido, foi recuperado.

Finalmente, a etapa de precipitação e ressuspensão do RNA bacteriano enriquecido consistiu em precipitar o RNA em etanol 100% gelado, acetato de sódio 3M e glicogênio (5 mg/ml). O RNA precipitado foi, então, ressuspendido em 25 µL de água livre de RNase. Quando necessário, as Oligo *MagBeads* residuais foram removidas com o auxílio de uma estante magnética.

A qualidade do RNA total bacteriano, bem como a retirada do RNA de mamíferos, foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico.

Os rRNA 5S, 16S e 23S foram removidos pelo *kit* Ribominus™ Transcriptome Isolation (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de hibridização seletiva, eliminação do rRNA, precipitação e ressuspensão do mRNA bacteriano enriquecido.

A etapa de hibridização seletiva e eliminação do rRNA consistiu em adicionar o RNA total bacteriano e 4 µL de RiboMinus™ Probe em 100 µL de tampão de hibridização (B10) e incubar a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi colocada no gelo por 30 segundos. A amostra foi, então, transferida para um tubo contendo as *beads* magnéticas RiboMinus™ previamente preparadas e foram incubadas a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante contendo o mRNA bacteriano enriquecido foi recuperado.

Por fim, a etapa de precipitação e ressuspensão do mRNA bacteriano enriquecido consistiu em precipitar o mRNA em etanol 100% gelado, acetato de sódio 3M e glicogênio (5 mg/ml). O RNA precipitado foi ressuspendido em 22 µL de água livre de RNase. Quando necessário, as *beads* magnéticas RiboMinus™ residuais foram removidas com o auxílio de uma estante magnética.

A depleção dos rRNA foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico.

4.10.3. Preparação da biblioteca de cDNA

Para a construção das bibliotecas foram utilizados os seguintes reagentes: cDNA Synthesis System Kit, Primer “random”GS Rapid Library Prep Nebulizers, GS Rapid Library Buffers Kit e GS Rapid Library Rgt/Adaptors Kit (Roche), segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de fragmentação do RNA, síntese da primeira fita de cDNA, síntese da segunda fita de cDNA, reparo das extremidades, ligação dos adaptadores, eliminação dos fragmentos pequenos e quantificação da biblioteca.

A etapa de fragmentação do RNA consistiu em adicionar ao mRNA bacteriano uma solução de fragmentação contendo 100mM de ZnCl_2 , a amostra foi, então, incubada a 70°C por 20 segundos e colocada no gelo logo em seguida. Tris-HCl 10 mM e EDTA 0,5 M foram adicionados para interromper a reação. As SPRI *beads* magnéticas RNAClean™ previamente preparadas foram adicionadas à amostra, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as *beads* foram lavadas três vezes com etanol 70% e secas à temperatura ambiente. Foram então adicionados 19 μL de Tris-HCl, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante contendo o mRNA fragmentado foi recuperado. A fragmentação química do mRNA bacteriano foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico, sendo o tamanho desejado dos fragmentos de mRNA de 450 a 1200 nucleotídeos.

A etapa de síntese da primeira fita de cDNA e segunda fita de cDNA, consistiram em adicionar ao mRNA fragmentado 4 μL de Roche primer “random” 400 μM , incubar a 70°C por 10 minutos e colocar no gelo por 2 minutos para a desnaturação do RNA. Em seguida, a primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 5x RT-*buffer* AMV, DTT, dNTPs, *Protector RNase Inhibitor* e AMV RT. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 minutos, 42°C por 1 hora e depois foram mantidos no gelo. A segunda fita do cDNA foi sintetizada adicionando-se 5x 2nd strand synthesis *buffer*, água destilada, dNTPs e 2nd strand *enzyme* a amostra com a primeira fita de cDNA sintetizada. Foi, então, realizada uma incubação a 16°C por 2 horas. Após a incubação, foi adicionada T4 DNA polimerase e a mistura foi incubada a 16°C por mais 5 minutos. Em seguida, foi adicionado EDTA 0,2 M para interromper a reação e o cDNA foi purificado com a utilização de *beads* magnéticas AMPure™ de maneira semelhante à etapa anterior.

As etapas de reparo das extremidades e ligação dos adaptadores consistiram em adicionar ao cDNA sintetizado RL 10x buffer, RL ATP, RL dNTP, RL T4 polimerase, RL PNK e RL taq polimerase. A mistura foi então colocada no termociclador por 1 ciclo de 25°C por 20 minutos e 72°C por 20 minutos. Em seguida, a ligação dos adaptadores foi realizada com a adição de RL *adaptator* e RL ligase à amostra com posterior incubação a 25°C por 10 minutos.

A etapa de eliminação dos fragmentos pequenos consistiu em adicionar as *beads* magnéticas AMPure™ previamente preparadas à amostra, a qual foi então incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, tampão TE (Tris-EDTA) e *sizing solution* foram adicionados a amostra e esta foi novamente incubada por 5 minutos à

temperatura ambiente. Após a incubação, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, as *beads* foram lavadas duas vezes com etanol 70% e secas à temperatura ambiente. Foram, então, adicionados 53 µM de tampão TE, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante, contendo a biblioteca de cDNA fragmentada, foi recuperado.

A qualidade e o tamanho da biblioteca de cDNA foram verificados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o High Sensitivity DNA Kit, sendo o tamanho desejado da biblioteca de cDNA de 600 a 1200 pares de bases. A quantificação da biblioteca foi feita utilizando-se o fluorímetro Synergy2 (Biotek) (485nm de excitação/528nm emissão) e o *software Rapid library quantitation calculator* disponível no site www.my454.com/my454.

4.10.4. PCR em emulsão (emPCR)

A PCR em emulsão foi realizada com os reagentes: GS Junior emPCR Reagents (Lib-L), GS Junior emPCR Bead Recovery Reagents e GS Junior emPCR Oil & Breaking Kit (Roche), segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de preparação do *Mock Mix* e pré-emulsão, captura da biblioteca de cDNA, emulsificação, amplificação, recuperação das *beads*, enriquecimento das *beads* da biblioteca de DNA e hibridação com o *primer* de sequenciamento.

As etapas de preparação do *Mock Mix* e pré-emulsão consistiram em adicionar o *Mock Mix* à água livre de DNase e agitar no UTDD (*Ultra Turrax Tube Driver*) a 4000 rpm por 2 minutos.

A etapa de captura da biblioteca de cDNA consistiu em desnaturar a biblioteca de cDNA, incubando-a por 2 minutos a 95°C. Em seguida, foi calculado o volume necessário da biblioteca para a emPCR, de acordo com o seguinte cálculo:

$$\mu\text{L de biblioteca de DNA por tubo} = \frac{\text{moléculas desejadas por bead} \times 10^6 \text{ beads}}{\text{concentração da biblioteca (moléculas}/\mu\text{L)}}$$

O volume necessário de biblioteca foi então adicionado às *beads* de captura previamente preparadas.

A etapa de emulsificação consistiu em adicionar o *Live Amp Mix* composto de água livre de RNase, aditivo, *Amp Mix*, *Amp Primer*, *Enzyme Mix* e PPIase ao tubo com a biblioteca capturada e agitar no UTDD a 2000 rpm por 5 minutos.

A etapa de amplificação consistiu em adicionar 100 µL da emulsão em cada um dos poços de uma placa de 96 poços para PCR. As condições da emPCR foram: 4 minutos a 94°C e 50 ciclos de 30 segundos a 94°C, 4,5 minutos a 58°C e 30 segundos a 68°C. A PCR foi mantida a 10°C até sua retirada do termociclador.

A etapa de recuperação das *beads* consistiu em remover a emulsão dos poços com o auxílio de uma bomba a vácuo. Os poços foram lavados com isopropanol para a recuperação do máximo de *beads*. Foram, então, realizadas três lavagens com isopropanol, uma com etanol e uma com *enhancing buffer*, tendo sido realizadas centrifugações a 930 xg por 5 minutos entre cada lavagem. Por fim, a mistura foi transferida para um tubo de 1,7 ml de modo que restasse apenas o *pellet* de *beads* em aproximadamente 1 ml de *enhancing buffer*.

A etapa de enriquecimento das *beads* da biblioteca de DNA consistiu em adicionar uma solução de NaOH 125 mM (*melting solution*) ao tubo com a biblioteca recuperada e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Foram então adicionados *annealing buffer*, e *enrich primer* e a mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, colocado no gelo por 2 minutos. Após a incubação, foram feitas três lavagens com *enhancing buffer* com breves centrifugações e descarte do sobrenadante entre as lavagens. Após as lavagens, o tubo foi colocado em uma estante magnética e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido uma vez e ao final foi adicionado *enhancing buffer* às *beads* restantes. As *beads* foram então agitadas em um LabQuake™ (Revolver) à temperatura ambiente por 5 minutos. O tubo foi novamente colocado em uma estante magnética e o sobrenadante foi descartado. As *beads* foram, então, lavadas com *enhancing buffer* até que não houvesse mais *beads* no sobrenadante. As *beads* enriquecidas foram lavadas duas vezes com *melting solution*, tendo sido recolhido o sobrenadante com o DNA enriquecido. Foram, então, realizadas três lavagens do DNA enriquecido com *annealing buffer* e, ao final, foi adicionado *annealing buffer* após a última lavagem.

A etapa de hibridação com o *primer* de sequenciamento consistiu em adicionar o *primer* de sequenciamento à amostra, incubar a 65°C por 5 minutos e depois colocar no gelo por 2 minutos. Foram feitas três lavagens com *annealing buffer*, de modo que as *beads* enriquecidas ficaram prontas para o sequenciamento.

4.10.5. Sequenciamento do transcriptoma

O sequenciamento do RNA foi realizado através da plataforma 454 GS Junior (Roche) com o protocolo de *shotgun* e comprimento de *reads* de 400 nucleotídeos. Para sequenciamento,

os reagentes necessários foram: *GS Junior Titanium Sequencing Reagents and Enzymes*, *GS Junior Sequencing Buffers*, *GS Junior Packing Beads* e *GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit*, segundo as instruções do fabricante, as quais consistiram nas etapas de pré-lavagem do equipamento 454 GS Junior, preparação e deposição das *beads* na placa de sequenciamento, inicialização do equipamento com reagentes e tampões e a corrida do sequenciamento.

Enquanto as etapas de pré-lavagem e inicialização do equipamento 454 GS Junior eram realizadas, foi feita simultaneamente à etapa de preparação e deposição das *beads* na placa de sequenciamento, que consistiu na montagem do dispositivo de deposição de *beads*, contendo a placa de sequenciamento, na adição de *bead buffer 2* (BB2) previamente preparado seguida de centrifugação a 1620 xg por 5 minutos. O BB2 contido na placa de sequenciamento foi, então, retirado e descartado. Em seguida, foi pipetada a primeira camada (pré-camada de *enzyme beads*) e centrifugada a 1620 xg por 5 minutos. O sobrenadante do interior do dispositivo de deposição de *beads* foi removido e a segunda camada (DNA e *packing beads*) foi adicionada à placa de sequenciamento, a qual foi centrifugada a 1620 xg por 10 minutos. O sobrenadante do interior do dispositivo de deposição de *beads* foi removido, a terceira camada (pós-camada de *enzyme beads*) foi adicionada, com posterior centrifugação a 1620 xg por 10 minutos. O sobrenadante do interior do dispositivo de deposição de *beads* foi removido, a quarta camada (*beads* de PPIase) foi adicionada e a placa de sequenciamento centrifugada à 1620 xg por 5 minutos. A placa foi então colocada no equipamento 454 GS Junior e deu-se início à corrida do sequenciamento.

4.10.6. Análise do RNA-seq

Para a análise do RNA-seq, inicialmente, foi realizada uma montagem no *software* Newbler Reference Mapper (454/Roche) utilizando como entrada os arquivos sff (*standard flowgram format*) gerados pelo sequenciador GS Junior (Roche) após as corridas. Foram utilizados os genomas completos de *Y. kristensenii* Y321 (número de acesso CP009997.1) e *Y. enterocolitica* 8081 (número de acesso NC_008800.1), bem como, o plasmídio pYV de *Y. enterocolitica* 8081 (número de acesso NC_008791.1) como referências.

As montagens forneceram arquivos *fna* (*FASTA nucleic acid*) para todos os *contigs* encontrados para cada um dos quatro sequenciamentos, os quais foram analisados pelo *software* Blast2Go (Conesa e Götz, 2008). A análise pelo *software* Blast2Go forneceu dados de anotação funcional para cada um dos *contigs* obtidos.

Para a realização de uma análise quantitativa foi utilizado o *website*: <https://usegalaxy.org/>. A montagem foi feita utilizando-se o *software* Tophat (Kim *et al.*, 2013) e a análise da expressão gênica foi feita pelo *software* Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Reconfirmação da pureza, caracterização fenotípica e reconfirmação sorológica

Todas as 118 linhagens de *Y. enterocolitica*-like e as quatro *Y. enterocolitica* listadas na Tabela 4 estavam puras e foram reconfirmadas fenotipicamente como sendo pertencentes a espécie previamente determinada, bem como, apresentaram o O-antígeno previamente determinado.

5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada através de uma eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% para todas as 118 linhagens de *Y. enterocolitica*-like e as quatro *Y. enterocolitica* utilizadas como controle positivo na pesquisa dos marcadores de virulência listadas na Tabela 4. A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese para a avaliação da integridade do DNA genômico.

Todas as linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas apresentaram pureza entre 1,70 e 1,90 e foram consideradas satisfatórias para a utilização na pesquisa dos marcadores de virulência por PCR.

Figura 1 - Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18, linhagens representativas de *Yersinia enterocolitica*-like estudadas: FCF 1 (1), FCF 162 (2), FCF 163 (3), FCF 168 (4), FCF 172 (5), FCF 182 (6), FCF 183 (7), FCF 184 (8), FCF 187 (9), FCF 188 (10), FCF 226 (11), FCF 239 (12), FCF 276 (13), FCF 310 (14), FCF 400 (15), FCF 411 (16), FCF 412 (17), FCF 413 (18).

5.3. Genes relacionados à virulência

As frequências dos genes relacionados à virulência detectados por PCR em *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* são mostradas nas Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente.

Tabela 6 – Frequência dos genes relacionados à virulência *ail*, *ystA*, *ystB*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC* e *virF* em 50 linhagens de *Y. frederiksenii* isoladas de alimentos, ambiente, animal e humanos

Genes	Número de linhagens positivas (%)				
	Total (%) (n=50)	Alimentos (%) (n=37)	Ambiente (%) (n=10)	Animais (%) (n=1)	Humanos (%) (n=2)
<i>ail</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>ystA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>ystB</i>	9 (18)	6 (12)	2 (4)	ND	1 (2)
<i>virF</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>myfA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>fepA</i>	22 (44)	20 (40)	ND	1 (2)	1 (2)
<i>fepD</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>fes</i>	22 (44)	15 (30)	6 (12)	1 (2)	ND
<i>tccC</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>hreP</i>	ND	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado

Tabela 7 – Frequência dos genes relacionados à virulência *ail*, *ystA*, *ystB*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC* e *virF* em 55 linhagens de *Y. intermedia* isoladas de alimentos, ambiente, animal e humano

Genes	Número de linhagens positivas (%)				
	Total (%) (n=55)	Alimentos (%) (n=34)	Ambiente (%) (n=19)	Animais (%) (n=1)	Humanos (%) (n=1)
<i>ail</i>	29 (53)	16 (29)	11 (20)	1 (2)	1 (2)
<i>ystA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>ystB</i>	1 (2)	1 (2)	ND	ND	ND
<i>virF</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>myfA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>fepA</i>	19 (35)	12 (22)	5 (9)	1 (2)	1 (2)
<i>fepD</i>	1 (2)	1 (2)	ND	ND	ND
<i>fes</i>	53 (97)	32 (58)	19 (35)	1 (2)	1 (2)
<i>tccC</i>	19 (35)	8 (15)	11 (20)	ND	ND
<i>hreP</i>	1 (2)	1 (2)	ND	ND	ND

ND – não detectado

Tabela 8 – Frequência dos genes relacionados à virulência *ail*, *ystA*, *ystB*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC* e *virF* em 13 linhagens de *Y. kristensenii* isoladas de alimentos, ambiente e animal

Genes	Número de linhagens positivas (%)			
	Total (%) (n=13)	Alimentos (%) (n=9)	Ambiente (%) (n=3)	Animais (%) (n=1)
<i>ail</i>	8 (62)	5 (39)	3 (23)	ND
<i>ystA</i>	ND	ND	ND	ND
<i>ystB</i>	3 (23)	2 (15)	1 (8)	ND
<i>virF</i>	ND	ND	ND	ND
<i>myfA</i>	ND	ND	ND	ND
<i>fepA</i>	10 (77)	7 (54)	3 (23)	ND
<i>fepD</i>	7 (54)	5 (38)	1 (8)	1 (8)
<i>fes</i>	7 (54)	7 (54)	ND	ND
<i>tccC</i>	ND	ND	ND	ND
<i>hreP</i>	10 (77)	7 (54)	3 (23)	ND

ND – não detectado

5.4. Validação dos genes relacionados à virulência detectados por sequenciamento

Os fragmentos dos genes relacionados à virulência de linhagens representativas de *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* foram confirmados por sequenciamento, tendo sido utilizadas para a comparação as sequências com as maiores identidades para cada um dos fragmentos estudados. Oito genes *ail* de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii* apresentaram 100% de identidade com os genes de linhagens depositadas no GenBank (número de acesso KT209996.1). Um total de 12 genes *fepA*, sendo quatro de cada espécie, apresentaram identidades entre 85 e 87% quando comparadas com os genes de linhagens do GenBank

(número de acesso DQ144910.1). Um gene *fepD* de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii* mostraram 89% de identidade com os genes de linhagens do GenBank (número de acesso AY970519.1). Quatro genes *fes* de *Y. frederiksenii* e *Y. intermedia* e três de *Y. kristensenii* exibiram identidades entre 79 e 100% (número de acesso DQ144906.1). Um gene *hreP* de *Y. intermedia* e quatro de *Y. kristensenii* apresentaram 75% identidade (número de acesso AY966878.1), enquanto quatro genes *tccC* de *Y. kristensenii* mostraram identidades de 73% (número de acesso AJ920332.2). Quatro genes *ystB* de *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* cada e um de *Y. intermedia* apresentaram identidades entre 71 e 88% quando comparadas com os genes de linhagens do GenBank (número de acesso KM253284.1).

5.5. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 e HEp-2

5.5.1. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação

Todas as 50 linhagens de *Y. enterocolitica*-like destacadas na Tabela 4 com um * foram capazes de aderir a células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação; porém, a adesão ocorreu em níveis menores quando comparadas à *Y. enterocolitica* 8081. Apenas poucas linhagens de *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* foram capazes de invadir células Caco-2 após 24 horas de incubação, embora, em níveis menores que *Y. enterocolitica* 8081. Resultados similares foram observados para *Y. frederiksenii* isoladas de ambiente, animais e humanos; as exceções foram as linhagens isoladas de alimentos, que exibiram uma média de invasão de 1,1 vezes quando comparadas à *Y. enterocolitica* 8081. A Tabela 9 mostra as médias em vezes da adesão e invasão a células Caco-2 após 24 horas de incubação das 50 *Yersinia* spp. comparadas à *Y. enterocolitica* 8081.

Tabela 9 – Médias de adesão e invasão a células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação de 20 *Y. frederiksenii*, 20 *Y. intermedia* e 10 *Y. kristensenii* comparadas à *Y. enterocolitica* 8081 (em vezes)

Espécies	Adesão				Invasão			
	Alimento	Ambiente	Animal	Humano	Alimento	Ambiente	Animal	Humano
<i>Y. frederiksenii</i>	0,7x	0,2x	0,1x	0,3x	1,1x	0	0,1x	0
<i>Y. intermedia</i>	0,5x	0,6x	0,3x	0,3x	0,4x	0	0	0
<i>Y. kristensenii</i>	0,4x	0,3x	0,5x	NA	0,4x	0	0	NA

NA – não se aplica

5.5.2. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação

As seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604)

destacadas com um † na Tabela 4 foram capazes de aderir e invadir células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação. A exceção foi *Y. intermedia* FCF 321, que foi incapaz de invadir as células Caco-2 neste período (Tabela 10). A maioria das linhagens de *Y. enterocolitica*-like testadas aderiram e invadiram as células em menores níveis do que *Y. enterocolitica* 8081. Contudo, duas linhagens (*Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461) apresentaram elevado potencial de invasão, 45 e 7,2 vezes maior que a de *Y. enterocolitica* 8081, respectivamente (Tabela 10). A Tabela 10 mostra em vezes a adesão e invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação das seis *Yersinia* spp. comparadas à *Y. enterocolitica* 8081.

5.5.3. Adesão e invasão bacterianas a células Caco-2 após 12 dias de pré-incubação

As seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) destacadas com um † na Tabela 4 foram capazes de aderir e invadir células Caco-2 após 12 dias de pré-incubação, porém, em níveis menores que *Y. enterocolitica* 8081. A Tabela 10 mostra em vezes a adesão e invasão a células Caco-2 após 12 dias de pré-incubação das seis *Yersinia* spp. comparadas à *Y. enterocolitica* 8081.

5.5.4. Adesão e invasão bacterianas a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação

As seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) destacadas com um † na Tabela 4 foram capazes de aderir e invadir células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação, todavia, em níveis menores que *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 10). A exceção foi *Y. intermedia* IP 8181, que foi incapaz de invadir as células HEp-2 após 48 horas de incubação. A Tabela 10 mostra em vezes a adesão e invasão a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação das seis *Yersinia* spp. comparadas à *Y. enterocolitica* 8081.

Tabela 10 – Adesão e invasão a células Caco-2 após cinco e 12 dias de incubação e a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação de duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604), isoladas de fontes clínicas e não clínicas, comparadas à *Y. enterocolitica* 8081 (em vezes)

Condições do ensaio	Linhagens	Espécies	Fonte	Adesão	Invasão	Genes
Caco-2 (5 dias)	FCF 410	<i>Y. kristensenii</i>	Alimentos	0,20x	45,0x	<i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
	FCF 604	<i>Y. kristensenii</i>	Animais	0,10x	0,2x	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>
	FCF 461	<i>Y. frederiksenii</i>	Alimentos	0,20x	7,2x	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
	FCF 379	<i>Y. frederiksenii</i>	Animais	0,50x	1,0x	<i>fes</i>
	FCF 321	<i>Y. intermedia</i>	Ambiente	0,20x	-	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
	IP 8181	<i>Y. intermedia</i>	Humanos	0,20x	0,2x	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
Caco-2 (12 dias)	FCF 410	<i>Y. kristensenii</i>	Alimentos	0,30x	0,03x	<i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
	FCF 604	<i>Y. kristensenii</i>	Animais	0,10x	0,01x	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>
	FCF 461	<i>Y. frederiksenii</i>	Alimentos	0,20x	0,01x	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
	FCF 379	<i>Y. frederiksenii</i>	Animais	0,05x	0,01x	<i>fes</i>
	FCF 321	<i>Y. intermedia</i>	Ambiente	0,07x	0,67x	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
	IP 8181	<i>Y. intermedia</i>	Humanos	0,10x	0,03x	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
HEp-2 (48 horas)	FCF 410	<i>Y. kristensenii</i>	Alimentos	0,40x	0,024x	<i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
	FCF 604	<i>Y. kristensenii</i>	Animais	0,07x	0,001x	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>
	FCF 461	<i>Y. frederiksenii</i>	Alimentos	0,10x	0,001x	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
	FCF 379	<i>Y. frederiksenii</i>	Animais	0,20x	0,002x	<i>fes</i>
	FCF 321	<i>Y. intermedia</i>	Ambiente	0,04x	0,001x	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
	IP 8181	<i>Y. intermedia</i>	Humanos	0,04x	-	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>

5.6. Ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937

Quatro das seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like estudadas, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) destacadas com um † na Tabela 4 e o controle *Y. enterocolitica* 8081 foram capazes de sobreviver no interior dos macrófagos humanos U937, dentre as linhagens, destacaram-se as porcentagens de sobrevivência de *Y. frederiksenii* FCF 461 (40,0%) e *Y. frederiksenii* FCF 379 (24,6%), que foram superiores as do controle *Y. enterocolitica* 8081 (13,4%) (Tabela 11). As exceções foram *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. intermedia* FCF 321, as quais não sobreviveram nos macrófagos. A Tabela 11 mostra a porcentagem de sobrevivência em macrófagos U937 ativados com PMA por 48h após 3 dias de pré-incubação das seis *Yersinia* spp. e *Y. enterocolitica* 8081.

Tabela 11 - Porcentagem de sobrevivência em macrófagos U937 ativados após três dias de pré-incubação de duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) e *Y. enterocolitica* 8081

Linhagens	Espécies	Origem	Sobrevivência (%)
FCF 410	<i>Y. kristensenii</i>	Alimentos	0,0
FCF 604	<i>Y. kristensenii</i>	Animais	5,1
FCF 461	<i>Y. frederiksenii</i>	Alimentos	40,0
FCF 379	<i>Y. frederiksenii</i>	Animais	24,6
FCF 321	<i>Y. intermedia</i>	Ambiente	0,0
IP 8181	<i>Y. intermedia</i>	Humanos	8,3
8081	<i>Y. enterocolitica</i>	Humanos	13,4

5.6.1. Ensaio de exclusão do azul de tripano

Os macrófagos U937 ativados com PMA por 48h após três dias de incubação estavam viáveis após infecção com as seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) destacadas com um † na Tabela 4 e o controle *Y. enterocolitica* 8081. A Tabela 12 mostra a porcentagem de viabilidade celular de macrófagos U937 ativados com PMA por 48h após três dias de pré-incubação e infectados pelas seis *Yersinia* spp. e *Y. enterocolitica* 8081.

Tabela 12 – Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos U937 ativados após três dias de pré-incubação infectados por duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181), duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF 604) e *Y. enterocolitica* 8081

Linhagens	Espécies	Origem	Viabilidade (%)
FCF 410	<i>Y. kristensenii</i>	Alimentos	49
FCF 604	<i>Y. kristensenii</i>	Animais	48
FCF 461	<i>Y. frederiksenii</i>	Alimentos	51
FCF 379	<i>Y. frederiksenii</i>	Animais	42
FCF 321	<i>Y. Intermedia</i>	Ambiente	34
IP 8181	<i>Y. Intermedia</i>	Humanos	34
8081	<i>Y. enterocolitica</i>	Humanos	34

5.7. Microscopia eletrônica de varredura

A MEV das células HEp-2 após 48 horas de incubação e Caco-2 após cinco dias de incubação com as seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like, incluindo duas *Y. frederiksenii* (FCF 461 e FCF 379), duas *Y. intermedia* (FCF 321 e IP 8181) e duas *Y. kristensenii* (FCF 410 e FCF

604) destacadas com um † na Tabela 4 mostraram bactérias na superfície em contato com a filipódia celular. As bactérias estavam distribuídas tanto individualmente quanto em aglomerados pequenos (Figura 2).

Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura representativa do ensaio de adesão em células Caco-2 e HEp-2. Microscopia eletrônica de varredura de *Y. frederiksenii* FCF 379 (A), *Y. intermedia* IP 8181 (B) e *Y. kristensenii* FCF 410 (C) aderindo a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação; *Y. frederiksenii* FCF 461 (D), *Y. intermedia* FCF 321 (E) e *Y. kristensenii* FCF 410 (F) aderindo a células Caco-2 após 12 dias de pré-incubação; *Y. frederiksenii* FCF 461 (G), *Y. intermedia* IP 8181 (H) e *Y. kristensenii* FCF 410 (I) aderindo a células HEp-2 após 48 horas de pré-incubação. A barra de referência é igual a 2 µm em A, B, C, G, H e I e a 5 µm em D, E e F.

5.8.1. Extração e verificação da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total extraído foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081. Todas as linhagens de *Yersinia* spp. estudadas apresentaram pureza acima de 2,0 e foram consideradas satisfatórias para o enriquecimento do mRNA.

A Figura 3 traz um eletroferograma representativo de uma corrida para a avaliação da qualidade do RNA total. No eletroferograma, foi possível observar os quatro picos referentes aos rRNAs bacterianos (rRNA 16S e rRNA 23S) e eucarióticos (rRNA 18S e rRNA 28S). No gel virtual, os quatro picos são representados na forma de bandas.

Figura 3 - Eletroferograma representativo da qualidade do RNA total verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y, [FU], representa as unidades de fluorescência e o eixo x, [nt], representa o número de nucleotídeos.

5.8.2. Enriquecimento do mRNA de *Yersinia* spp.

A qualidade do RNA total de bactéria após enriquecimento pelo *kit* MICROBEnrich™ (Ambion) foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081. Todas as linhagens de *Yersinia* spp. estudadas apresentaram a qualidade necessária e foram consideradas satisfatórias para o enriquecimento do mRNA.

A Figura 4 traz um eletroferograma representativo de uma corrida para a avaliação da qualidade do RNA total bacteriano. No eletroferograma, foi possível observar o desaparecimento dos picos referentes aos rRNAs eucarióticos (rRNA 18S e rRNA 28S), tendo

restando somente os rRNAs bacterianos (rRNA 16S e rRNA 23S). No gel virtual, os dois picos restantes são representados na forma de bandas.

Figura 4 - Eletroferograma representativo da qualidade do RNA total bacteriano após enriquecimento pelo *kit* MICROBEnrich™ verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y, [FU], representa as unidades de fluorescência e o eixo x, [nt], representa o número de nucleotídeos.

A depleção dos rRNA após enriquecimento pelo *kit* Ribominus™ Transcriptome Isolation (Life Technologies) foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081. Todas as linhagens de *Yersinia* spp. estudadas tiveram seus rRNA depletados e foram consideradas satisfatórias para a preparação da biblioteca de cDNA.

A Figura 5 traz um eletroferograma representativo de uma corrida para a verificação da depleção dos rRNA. No eletroferograma, foi possível observar o desaparecimento dos picos referentes aos rRNAs bacterianos (rRNA 16S e rRNA 23S). No gel virtual, foi possível observar o desaparecimento das bandas, restando apenas o mRNA bacteriano.

Figura 5 - Eletroferograma representativo da depleção dos rRNA após enriquecimento pelo *kit* Ribominus™ Transcriptome Isolation verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y, [FU], representa as unidades de fluorescência e o eixo x, [nt], representa o número de nucleotídeos.

5.8.3. Preparação da biblioteca de cDNA

A fragmentação do mRNA bacteriano foi verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081, sendo o tamanho desejado dos fragmentos de mRNA de 450 a 1200 nucleotídeos. Todas as linhagens de *Yersinia* spp. estudadas apresentaram a maioria fragmentos de mRNA de 450 a 1200 nucleotídeos e foram consideradas satisfatórias para a preparação da biblioteca de cDNA.

A Figura 6 traz um eletroferograma representativo de uma corrida para a avaliação da fragmentação do mRNA bacteriano. No eletroferograma, foi possível observar a fragmentação do mRNA bacteriano em fragmentos de 450 a 1200 nucleotídeos. No gel virtual, foi possível observar a grande concentração de fragmentos de mRNA bacteriano na faixa de tamanho desejado.

Figura 6 - Eletroferograma representativo da fragmentação do mRNA bacteriano por uma solução contendo 100mM de ZnCl_2 verificada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o *kit* RNA 6000 Pico para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y, [FU], representa as unidades de fluorescência e o eixo x, [nt], representa o número de nucleotídeos.

A qualidade e o tamanho da biblioteca de cDNA foram verificados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o High Sensitivity DNA Kit para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081, sendo o tamanho desejado da biblioteca de cDNA de 600 a 1200 pares de bases. Todas as linhagens de *Yersinia* spp. estudadas apresentaram bibliotecas de boa qualidade com tamanho de 600 a 1200 pares de base, bem como tiveram suas concentrações aprovadas pelo *software* Rapid library quantitation calculator (454/Roche) e foram consideradas satisfatórias para o sequenciamento do RNA.

A Figura 7 traz um eletroferograma representativo de uma corrida para a avaliação da qualidade e do tamanho da biblioteca de cDNA. No eletroferograma, foi possível observar a fragmentação da maior parte do cDNA bacteriano em fragmentos de 600 a 1200 nucleotídeos. No gel virtual, foi possível observar a grande concentração de fragmentos de cDNA bacteriano na faixa de tamanho desejado.

Figura 7 - Eletroferograma representativo da qualidade e do tamanho da biblioteca de cDNA verificados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando o High Sensitivity DNA Kit para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y, [FU], representa as unidades de fluorescência e o eixo x, [bp], representa o número de pares de bases.

5.8.4. Sequenciamento do transcriptoma

O sequenciamento do RNA foi realizado através da plataforma 454 GS Junior (Roche) com o protocolo de *shotgun* e comprimento de *reads* de aproximadamente 400 nucleotídeos para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081.

A Figura 8 traz um histograma representativo de uma corrida de RNA-seq para a avaliação da variação do tamanho das *reads* obtidas para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410.

Figura 8 - Histograma representativo de uma corrida de RNA-seq para a avaliação da variação do tamanho das *reads* obtidas para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y representa o número (quantidade) de *reads* e o eixo x representa o número de pares de bases (tamanho) das *reads* obtidas.

Na montagem pelo *software* Newbler Reference Mapper (454/Roche), para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410, foram sequenciadas 63941385 e 52352879 bases na primeira e segunda corridas, respectivamente. Contudo, apenas 18,10% e 16,43% das *reads* se alinharam com o genoma de *Y. kristensenii* Y321 (número de acesso CP009997.1 - genoma), tendo sido obtidos 332 e 347 *contigs* em cada corrida.

Na montagem pelo *software* Newbler Reference Mapper (454/Roche), para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081, foram de sequenciadas 45224344 e 62180579 bases nas duas corridas. Todavia, apenas 36,87% e 39,34% das *reads* se alinharam com o genoma de *Y. enterocolitica* 8081 (número de acesso NC_008800.1 – genoma; e NC_008791.1 – plasmidio pYV), tendo sido obtidos 1495 e 1374 *contigs*, respectivamente.

Análises preliminares pelo *software* Blast2Go forneceram informações sobre funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos. Contudo, devido à baixa cobertura do sequenciamento de *Y. kristensenii* FCF 410 e à grande diferença na quantidade de *contigs* obtidos entre *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081, não foi possível fazer comparações entre as referidas linhagens, sendo os dados apenas qualitativos.

As Figura 9, Figura 10 e Figura 11 trazem os dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410.

As Figura 12, Figura 13 e Figura 14 trazem os dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre função molecular, processos biológicos e componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081.

Figura 9 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre funções moleculares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y representa processos moleculares e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Figura 10 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre processos biológicos referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y representa processos biológicos e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Figura 11 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. O eixo y representa componentes celulares e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Figura 12 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre funções moleculares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081. O eixo y representa processos moleculares e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Figura 13 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre processos biológicos referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081. O eixo y representa processos biológicos e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Figura 14 - Dados fornecidos pelo *software* Blast2Go sobre componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081. O eixo y representa componentes celulares e o eixo x representa o número de *contigs* obtidos.

Não foi possível fazer a análise pelo *website*: <https://usegalaxy.org/>, pois a montagem pelo *software* Tophat apresentou um alinhamento muito baixo para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. Deste modo, a análise da expressão gênica pelo *software* Cuffdiff foi inviabilizada, uma vez que ambos os sequenciamentos da linhagem *Y. kristensenii* FCF 410 não obtiveram a cobertura necessária para análise.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Embora poucos, existem relatos de espécies de *Y. enterocolitica*-like isoladas de pacientes e animais com desordens gastrintestinais. Portanto, a existência de novos mecanismos de virulência tem sido proposta nessas espécies de modo que possam estar associados a causa de doenças em humanos (Delor *et al.*, 1990; Robins-Browne *et al.*, 1991; Bottone, 1997; Sulakvelidze *et al.*, 1999; Sulakvelidze, 2000; Falcão *et al.*, 2008).

Diferentemente de *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*, cuja patogenicidade está bem estabelecida e caracterizada, as espécies de *Y. enterocolitica*-like não foram extensivamente estudadas (Miller e Falkow, 1988; Carniel, Guilvout e Prentice, 1996; Revell e Miller, 2001; Collyn *et al.*, 2004; Cathelyn *et al.*, 2007). *Y. enterocolitica*-like tem significado clínico controverso, porque seu potencial patogênico não foi claramente demonstrado e elucidado. Assim, alguns pesquisadores consideram todas as espécies de *Y. enterocolitica*-like não patogênicas para os humanos, enquanto outros acreditam que pelo menos algumas espécies são capazes de causar doenças. Contudo, os possíveis mecanismos alternativos de patogenicidade ainda não foram determinados (Sulakvelidze, 2000).

Os poucos estudos sobre o potencial patogênico de espécies de *Y. enterocolitica*-like verificaram a presença de marcadores clássicos de virulência de *Y. enterocolitica* em *Y. enterocolitica*-like. Todavia, esses estudos negligenciaram a presença de outros possíveis mecanismos de virulência em *Y. enterocolitica*-like que poderiam estar relacionados ao seu potencial de causar doença (Robins-Browne, Cianciosi e Morris, 1990; Sulakvelidze, 2000). Especificamente, no Brasil, (Falcão *et al.*, 2004) determinaram a resistência a antibióticos e alguns marcadores de virulência fenotípicos de 76 linhagens de *Y. enterocolitica*-like isoladas de ambiente, incluindo 64 *Y. intermedia*, nove *Y. frederiksenii* e três *Y. kristensenii*; contudo, essas linhagens não foram testadas quanto a frequência de genes relacionados à virulência.

No presente trabalho, o potencial patogênico de 118 linhagens de *Y. enterocolitica*-like (50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* e 13 *Y. kristensenii*) foi avaliado pela pesquisa dos genes relacionados à virulência *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *myfA*, *tccC*, *ystA*, *ystB* e *virF*. O gene *ail*, que codifica uma importante proteína relacionada à adesão e invasão de *Yersinia* enteropatogênica, foi detectado em *Y. intermedia* (n=29, 53%) e *Y. kristensenii* (n=8, 62%) (Tabela 7 e Tabela 8). Esse gene foi previamente reportado para uma linhagem de *Y. kristensenii* isolada de roedor na Tchecoslováquia e uma linhagem clínica de *Y. intermedia* (Robins-Browne *et al.*, 1991; Cheyne *et al.*, 2010). Sete sequências do gene *ail* de *Y. frederiksenii*, três de *Y. intermedia* e duas de *Y. kristensenii* foram depositadas no GenBank, contudo, não há

publicações referentes a essas linhagens. Alguns estudos reportaram a presença do gene *ail* em poucas linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, que são consideradas não patogênicas (Robins-Browne, Cianciosi e Morris, 1990; Thoerner *et al.*, 2003; Falcão *et al.*, 2006; Cheyne *et al.*, 2010; Kraushaar *et al.*, 2011; Sihvonen *et al.*, 2011). Zheng *et al.* (2008) reportaram uma linhagem de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, a qual apresentava o gene *ail*, isolada de fezes diarreicas humanas na China. Cheyne *et al.* (2010) reportaram três linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A isoladas no Canadá positivas para o gene *ail*. Kraushaar *et al.* (2011) estudou uma linhagem de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A isolada de carne de porco moída na Alemanha. Sihvonen *et al.* (2011) reportaram duas linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A positivas para o gene *ail*, a primeira isolada das fezes de uma mulher com sintomas gastroenterite e a segunda de cenouras, ambas na Finlândia. Falcão *et al.* (2006) reportaram uma linhagem de *Y. enterocolitica* do biosorogrupo 1A/O:10, isolada de leite, a qual apresentava o gene *ail*. Ademais, no Brasil, foi reportada a presença do gene *ail* em linhagens de *Y. enterocolitica* nos biotipos 2, 3 e 4, considerados patogênicos (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Assim, os resultados aqui encontrados são interessantes, pois mais da metade das linhagens de *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* estudadas possuíam o gene *ail* (Tabela 7 e Tabela 8).

Além disso, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que apenas a presença do gene *ail* não foi suficiente para causar um aumento significativo na capacidade de adesão e invasão a células de mamíferos, uma vez que as duas linhagens (*Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461), que apresentaram as maiores porcentagens de adesão e invasão a células Caco-2, não possuíam o gene *ail* (Tabela 10). Interessantemente, *Y. kristensenii* FCF 410 é do sorogrupo O:11, que foi reportado como um sorogrupo letal para camundongos (Robins-Browne *et al.*, 1991), e foi capaz de invadir células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação 45 vezes mais do que *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 10).

O gene *ystB*, que codifica uma enterotoxina termoestável de *Y. enterocolitica*, foi detectado em *Y. frederiksenii* (n=9, 18%), *Y. intermedia* (n=1, 2%) e *Y. kristensenii* (n=3, 23%) (Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8). Alguns genes homólogos ao *yst* foram previamente reportados para oito linhagens de *Y. kristensenii*, sendo quatro por Delor *et al.* (1990), três por Ibrahim, Liesack e Stackebrandt (1992), isoladas de ovelha, égua e humano nas Ilhas Feroe, França e Dinamarca, respectivamente, e uma por Ibrahim *et al.* (1997). Bhagat e Virdi (2007) reportaram 64 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *ystB*. No Brasil, foi reportada a presença do gene *ystA* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A, 2, 3 e 4 e

do gene *ystB* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A e 2 (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). (Falcão *et al.*, 2006) reportaram uma linhagem de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A isolada de leite, a qual apresentava o gene *ystA*. Campioni e Falcão (2014) reportaram 44 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 21 de origem clínica e 23 de origem não clínica, positivas para o gene *ystB*. Deste modo, o gene *ystB* pode ter um papel importante na patogênese e esta enterotoxina poderia ser hipoteticamente capaz de causar diarreia (Delor *et al.*, 1990; Ibrahim *et al.*, 1997).

Para estabelecer uma infecção, bactérias patogênicas precisam obter ferro dos tecidos dos mamíferos. O gene *fepA* estava presente em *Y. frederiksenii* (n=22, 44%), *Y. intermedia* (n=19, 35%) e *Y. kristensenii* (n=10, 77%), o gene *fepD* estava presente em *Y. intermedia* (n=1, 2%) e *Y. kristensenii* (n=7, 54%) e o gene *fes* estava presente em *Y. frederiksenii* (n=22, 44%), *Y. intermedia* (n=53, 97%) e *Y. kristensenii* (n=7, 54%) (Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8). Genes para transporte de sideróforos (*fepA* e *fepD*) e de liberação de ferro (*fes*) foram detectados em várias linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A (Bottone e Robin, 1977; Bottone, 1999; Schubert, Fischer e Heesemann, 1999; Bhagat e Viridi, 2007; Campioni e Falcão, 2014). Bhagat e Viridi (2007) reportaram 36 e 81 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam os genes *fepA* e *fepD*, respectivamente. Contudo, os genes *fepA*, *fepD* e *fes* não foram detectados nas linhagens de *Y. enterocolitica*-like testadas por (Schubert, Fischer e Heesemann, 1999). Bhagat e Viridi (2007) reportaram 81 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *fes*. Atualmente, há duas sequências do gene *fepA* de *Y. frederiksenii*, duas de *Y. intermedia* e três de *Y. kristensenii*; duas sequências do gene *fepD* de *Y. frederiksenii*, duas de *Y. intermedia* e uma de *Y. kristensenii*; e duas sequências do gene *fes* de *Y. frederiksenii*, duas de *Y. intermedia* e duas de *Y. kristensenii* depositadas no GenBank, porém, não há publicações referentes a essas linhagens. No Brasil, foi reportada a presença dos genes *fepD* e *fes* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A e 2, e do gene *fepA* em *Y. enterocolitica* do biotipo 1A (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Campioni e Falcão (2014) reportaram 37 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 16 de origem clínica e 21 de origem não clínica, positivas para o gene *fepA*; 45 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 22 de origem clínica e 23 de origem não clínica, positivas para o gene *fepD*; e 39 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 16 de origem clínica e 23 de origem não clínica, positivas para o gene *fes*.

O gene *hreP*, que codifica uma protease subtilisina-toxina-like, foi encontrado em *Y. intermedia* (n=1, 2%) e *Y. kristensenii* (n=10, 77%) (Tabela 7 e Tabela 8). O papel dessa

protease como fator de virulência é bem estabelecido em *Y. enterocolitica* do biotipo 1B, *Y. pestis* e *Y. ruckeri* (Sodeinde *et al.*, 1992; Heusipp, Young e Miller, 2001; Fernández *et al.*, 2002). Um gene homólogo ao *hreP* foi detectado em uma linhagem de *Y. frederiksenii* ATCC33641 (Bhagat e Viridi, 2007). Além disso, esse gene não foi encontrado em *Y. intermedia* e *Y. kristensenii*, tendo sido reportado apenas em linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A (Bhagat e Viridi, 2007; Campioni e Falcão, 2014). Bhagat e Viridi (2007) reportaram 64 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *hreP*. Há duas sequências do gene *hreP* de *Y. frederiksenii* e duas de *Y. kristensenii* depositadas no GenBank, todavia, não há publicações referentes a essas linhagens. No Brasil, foi reportada a presença do gene *hreP* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A e 2 (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Campioni e Falcão (2014) reportaram 44 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 21 de origem clínica e 23 de origem não clínica, positivas para o gene *hreP*.

O gene homólogo ao complexo de toxina inseticida *tccC*, que foi reportado por ter um possível papel na virulência de linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, foi encontrado em *Y. intermedia* (n=19, 35%) (Tabela 7). Não há dados disponíveis sobre a presença deste gene em *Y. enterocolitica*-like, tendo sido reportado apenas em linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A (Bhagat e Viridi, 2007; Campioni e Falcão, 2014). Bhagat e Viridi (2007) reportaram sete linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *tccC*. No Brasil, foi reportada a presença do gene *tccC* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A e 2 (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Campioni e Falcão (2014) reportaram sete linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo uma de origem clínica e seis de origem não clínica, positivas para o gene *tccC*.

Os genes *myfA*, *ystA* e *virF* não foram encontrados em nenhuma das *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* estudadas (Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8). O gene *myfA* não foi reportado para *Y. enterocolitica*-like, contudo, alguns estudos reportaram a presença do gene *myfA* em linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1998; Bhagat e Viridi, 2007; Batzilla, Heesemann e Rakin, 2011; Joutsen *et al.*, 2013; Campioni e Falcão, 2014). Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1998) reportaram 13 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A positivas para o gene *myfA*. Bhagat e Viridi (2007) reportaram 36 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *myfA*. Batzilla, Heesemann e Rakin (2011) reportaram duas linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo uma de origem clínica isolada de um surto em Newfoundland e uma de origem não clínica

isolada de água no Japão, positivas para o gene *myfA*. Três sequências do gene *myfA* de *Y. frederiksenii* e uma de *Y. kristensenii* foram depositadas no GenBank, todavia, não há publicações referentes a essas linhagens. No Brasil, foi reportada a presença do gene *myfA* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A e 2 (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Campioni e Falcão (2014) reportaram 28 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, sendo 12 de origem clínica e 16 de origem não clínica, positivas para o gene *myfA*. O gene *virF* foi detectado em uma linhagem de *Y. intermedia* isolada de porco na Grécia (Bhagat e Viridi, 2007). Contudo, em outros trabalhos esse gene não foi encontrado em *Y. intermedia* e *Y. kristensenii*, tendo sido reportado em linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A (Thoerner *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2008). Thoerner *et al.* (2003) reportaram três linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que apresentavam o gene *virF*. Zheng *et al.* (2008) reportaram três linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A, isoladas de fezes diarreicas na China, positivas para o gene *virF*. No Brasil, foi reportada a presença do gene *virF* em linhagens de *Y. enterocolitica* dos biotipos 1A, 2, 3 e 4 (Falcão *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2006; Campioni e Falcão, 2014; Frazão e Falcão, 2015). Paixão *et al.* (2013) reportaram 87 linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A positivas para o gene *virF*.

Não obstante, a presença dos genes *ail*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *tccC* e *ystB* em algumas linhagens de *Y. enterocolitica*-like foi confirmado tanto por PCR quanto por sequenciamento, indicando o possível potencial patogênico de algumas dessas linhagens.

Além disso, a habilidade de algumas linhagens de *Yersinia* de aderir e invadir células Caco-2 e HEp-2 após diferentes períodos de incubação foi testada. De modo geral, as linhagens de *Y. enterocolitica*-like mostraram uma capacidade reduzida de aderir a células Caco-2 e HEp-2 quando comparadas à *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 9 e Tabela 10). Além disso, apenas poucas linhagens das 50 *Y. enterocolitica*-like testadas foram capazes de invadir as células Caco-2 após 24 horas de pré-incubação e em níveis menores do que *Y. enterocolitica* 8081; as exceções foram as linhagens de *Y. frederiksenii* isoladas de alimentos (n=13), que, em média, exibiram um potencial de invasão que foi 1,1 vez maior que *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 9). Todas as linhagens de *Y. enterocolitica*-like testadas foram capazes de invadir células HEp-2, com exceção da linhagem *Y. intermedia* IP8181, porém a níveis menores do que *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 10). É importante mencionar que apesar dos níveis baixos de adesão e invasão das células HEp-2 por linhagens de *Y. enterocolitica*-like, esta linhagem celular se mostrou adequada para ensaios de adesão e invasão bacterianas. Os baixos níveis de

adesão e invasão foram devidos à comparação com *Y. enterocolitica* 8081, que apresentou uma grande capacidade de aderir e invadir células HEp-2.

Células Caco-2 são uma linhagem celular com uma baixa taxa de crescimento, assim, as células Caco-2 não ficavam 100% confluentes em 24 horas de incubação, condição requerida para a microscopia eletrônica. Além disso, era difícil manter as células aderidas nas placas de cultura durante os ensaios. Deste modo, foram necessários tempos de incubação maiores para o uso das células Caco-2 nos ensaios de microscopia. Assim, células Caco-2 foram testadas para os ensaios de adesão e invasão para as seis linhagens de *Y. enterocolitica*-like selecionadas para a microscopia após cinco e 12 dias de pré-incubação. Todas as linhagens de *Y. enterocolitica*-like testadas foram capazes de invadir células Caco-2 após cinco e 12 dias de pré-incubação, porém a níveis menores do que *Y. enterocolitica* 8081, com exceção da linhagem *Y. intermedia* FCF 321, a qual foi incapaz de invadir células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação. Ainda, *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461 apresentaram elevado potencial de invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação, os quais foram 45 e 7,2 vezes maiores do que o controle *Y. enterocolitica* 8081, respectivamente (Tabela 10). Deste modo, os ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos sugerem que a patogenicidade de *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* possa ser linhagem-dependente.

Não foram reportados ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos para *Y. enterocolitica*-like, contudo, esses ensaios foram realizados para algumas linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1998; Tennant, Grant e Robins-Browne, 2003; McNally *et al.*, 2006; McNally *et al.*, 2007). Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1998) reportaram o isolamento de linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A de pacientes sintomáticos. Apesar de não apresentarem os marcadores clássicos de virulência, esses isolados foram capazes de invadir células epiteliais HEp-2 e CHO e colonizar o trato intestinal de camundongos. McNally *et al.* (2006) e McNally *et al.* (2007) reportaram linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A capazes de invadir células epiteliais HEp-2.

A habilidade de algumas linhagens de *Yersinia* de sobreviver no interior de macrófagos humanos U937 também foi testada. O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 mostrou que, de modo geral, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* apresentam uma capacidade reduzida de sobreviver em macrófagos humanos U937 quando comparadas à *Y. enterocolitica* 8081, sendo que *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. intermedia* FCF 321 apresentaram uma taxa de sobrevivência de 0%. Contudo, as linhagens de *Y. frederiksenii* FCF 461 (40,0%) e *Y. frederiksenii* FCF 379 (24,6%) tiveram porcentagens de sobrevivência superior à

de *Y. enterocolitica* 8081 (13,4%) (Tabela 11). Esse resultado evidencia o potencial patogênico da linhagem *Y. frederiksenii* FCF 461, uma vez que, além de uma grande capacidade de invasão de 7,2x mais que *Y. enterocolitica* 8081 (Tabela 10), esta também foi capaz de sobreviver à resposta inume do hospedeiro. Ambas as linhagens de *Y. frederiksenii* testadas apresentaram elevada porcentagem de sobrevivência no interior dos macrófagos humanos U937. Entretanto, para concluir se a capacidade de sobrevivência em macrófagos é uma característica espécie-específica ou linhagem-dependente, uma quantidade maior de linhagens de *Y. frederiksenii* precisaria ter sido analisada. O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 evidenciou que algumas linhagens de *Y. frederiksenii* apresentaram uma elevada capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos, sendo capazes de sobreviver à resposta imune do hospedeiro.

Y. kristensenii FCF 410, que apresenrou alta capacidade de invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação (Tabela 10), não sobreviveu ao ensaio em macrófagos (Tabela 11), contudo, não se sabia se *Y. kristensenii* FCF 410 foi morta pelo macrófago ou se esta induziu o macrófago à apoptose, tendo sido liberada então no meio com antibiótico. Para testar esta hipótese, um ensaio de exclusão do azul de tripano foi realizado. Como os macrófagos U937 ativados com PMA por 48h após três dias de incubação estavam viáveis após infecção com as sete linhagens testadas (Tabela 12), pode-se inferir que *Y. kristensenii* FCF 410 realmente não foi capaz de sobreviver no interior dos macrófagos humanos U937. Todavia, há relatos de linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A que são capazes de evadir da destruição por células polimorfonucleares e complemento albergando-se no interior de células epiteliais, uma vez que foi observado que estas bactérias são capazes de replicarem-se e persistirem dentro destas células (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1999).

Não foram reportados ensaios de sobrevivência em macrófagos para *Y. enterocolitica*-like, contudo, esses ensaios foram realizados para algumas linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1999; Tennant, Grant e Robins-Browne, 2003; McNally *et al.*, 2006; McNally *et al.*, 2007). Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1999) mostrou que linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A isoladas de pacientes sintomáticos foram capazes de sobreviver em macrófagos. Além disso, foram capazes de escapar dos macrófagos e de células epiteliais por um mecanismo que se assemelhava a exocitose e que parecia não comprometer a integridade dessas células. McNally *et al.* (2006) e McNally *et al.* (2007) reportaram linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A capazes de sobreviver no interior de macrófagos humanos U937.

Aspectos morfológicos da adesão e invasão bacteriana foram visualizados por microscopia eletrônica. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização de bactérias aderidas às células de mamífero (Figura 2). Foi realizada, também, a microscopia eletrônica de transmissão (dados não apresentados), a qual revelou que, de modo geral, a integridade tanto das células Caco-2 quanto das células HEp-2 foi mantida mesmo para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461, que apresentaram elevada capacidade de invasão (Tabela 10). Esses achados podem indicar que apesar da capacidade de invasão de *Y. kristensenii* FCF 410 a células de mamíferos, a progressão das lesões celulares pode ocorrer a taxas mais baixas quando comparadas às espécies enteropatogênicas clássicas de *Yersinia*. Contudo, o ensaio foi comprometido devido à contaminação das células por *Mycoplasma*. Além disso, a quantidade de bactérias encontradas no interior das células foi muito abaixo do esperado para as linhagens *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. frederiksenii* FCF 461, que haviam apresentado grande capacidade de invasão (Tabela 10), o que pode ter sido causado por alterações nas células devido a contaminação. Adicionalmente, o gene *ail* não foi detectado nessas duas linhagens. Assim, mais experimentos que busquem unicamente novos mecanismos de virulência para *Y. enterocolitica*-like são necessários ao invés de apenas comparar *Y. enterocolitica* patogênica 8081 as espécies de *Y. enterocolitica*-like estudadas.

Não foi reportada a realização de microscopia eletrônica para *Y. enterocolitica*-like, contudo, esses ensaios foram realizados para algumas linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A (Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne, 1999; Tennant, Grant e Robins-Browne, 2003; McNally *et al.*, 2007). Grant, Bennett-Wood e Robins-Browne (1999) mostrou as interações entre macrófagos e linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A isoladas de pacientes sintomáticos por microscopia eletrônica de transmissão. McNally *et al.* (2007) reportaram a microscopia eletrônica de transmissão de linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A no interior de macrófagos humanos U937.

Além disso, presença de possíveis novos mecanismos de virulência foi avaliada a partir do sequenciamento de RNA extraído de uma linhagem de *Y. enterocolitica*-like nas condições do ensaio de invasão a células Caco-2 após cinco dias de pré-incubação. Poucos são os trabalhos na literatura que utilizam o RNA-seq para análises do perfil de expressão gênica de *Yersinia* spp., tendo sido a maioria dos trabalhos realizados com *Y. pestis* e *Y. enterocolitica*, duas das espécies mais bem estudadas e caracterizadas do gênero (Babujee *et al.*, 2013; Bent *et al.*, 2015; Stasulli *et al.*, 2015). Para *Y. pestis* foi realizado um RNA-seq para avaliar o perfil de transcrição do hospedeiro no interior das lesões pulmonares ricas em neutrófilos durante a peste

pneumônica na tentativa de determinar como *Y. pestis* altera a vida útil dos neutrófilos com o objetivo de compreender melhor os mecanismos pelos quais os neutrófilos normalmente trabalham em uma ampla gama de doenças em que a infiltração desses torna-se prejudicial para o hospedeiro (Stasulli *et al.*, 2015).

Outros poucos trabalhos de RNA-seq com *Yersinia* spp. foram publicados (Babujee *et al.*, 2013; Bent *et al.*, 2015; Stasulli *et al.*, 2015). Durante o curso de uma infecção por *Y. enterocolitica*, um número significativo de bactérias é mantido dentro dos vacúolos das células hospedeiras. Pouco se sabe sobre essa população e do papel que desempenha durante uma infecção. Para resolver esta questão e para elucidar os padrões de expressão dos genes de *Y. enterocolitica* biotipo 1B durante o curso de uma infecção *in vitro*, foram realizados, dentre outros experimentos, o sequenciamento do transcriptoma e a análise diferencial da expressão gênica da bactéria (Bent *et al.*, 2015). Apenas um RNA-seq de *Y. intermedia* não patogênica foi publicado. No entanto, nenhum aspecto relacionado à patogênese ou virulência foi abordado, tendo sido verificada apenas como a disponibilidade de oxigênio afeta a fisiologia de *yersiniae* (Babujee *et al.*, 2013).

Não foi possível fazer a análise pelo *website*: <https://usegalaxy.org/>, pois a montagem pelo *software* Tophat apresentou um alinhamento muito baixo para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410. Deste modo, a análise da expressão gênica pelo *software* Cuffdiff foi inviabilizada, uma vez que, para ambos os sequenciamentos da linhagem *Y. kristensenii* FCF 410, a cobertura do sequenciamento do RNA foi insuficiente para a análise da expressão diferencial. Ambas as linhagens estudadas apresentaram uma grande quantidade de RNA humano contaminante, apesar da utilização de *kits* para a eliminação do referido RNA. Por ser uma amostra complexa, proveniente do ensaio de invasão, e que, por isso, foi manipulada várias vezes ao longo do processo de extração de RNA total e enriquecimento do mRNA bacteriano, parte do RNA humano pode ter degradado perdendo sua cauda poli-A, a qual é imprescindível para a depleção do mRNA eucariótico.

Análises preliminares pelo *software* Blast2Go forneceram informações sobre funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares referentes aos *contigs* obtidos. Contudo, devido à baixa cobertura do sequenciamento de *Y. kristensenii* FCF 410 e à grande diferença na quantidade de *contigs* obtidos entre *Y. kristensenii* FCF 410 e *Y. enterocolitica* 8081, não foi possível fazer comparações entre as referidas linhagens, sendo os dados apenas qualitativos.

Além disso, posteriormente, descobriu-se que a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410 é bastante resistente à lise, o que resulta numa baixa concentração de RNA extraído. Enquanto para a linhagem *Y. enterocolitica* 8081 em caldo BHI, em apenas uma reação, eram obtidos aproximadamente 40 µg de RNA total, em uma reação para a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410 eram obtidos em média 2 µg de RNA total. Este resultado é uma possível explicação para a cobertura do RNA-seq desta linhagem ter sido tão baixa. É importante ressaltar que essa resistência à lise pode favorecer a linhagem *Y. kristensenii* FCF 410 a resistir quando no interior do hospedeiro.

Finalmente, a plataforma 454 GS Junior (Roche) não se mostrou adequada para a realização de sequenciamento de RNA de amostras provenientes de interações, uma vez que possíveis contaminações com o RNA do hospedeiro levam a uma diminuição exacerbada da cobertura do sequenciamento do RNA de interesse. Para interações, é mais indicado usar plataformas, as quais sejam capazes de fornecer uma quantidade maior de dados, como por exemplo, o Illumina MiSeq.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A presença dos genes relacionados à virulência encontrados em *Y. enterocolitica*-like neste estudo indicou o possível potencial patogênico de algumas dessas linhagens;
- Os ensaios de adesão e invasão a células de mamíferos sugerem que a patogenicidade de *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* possa ser linhagem-dependente;
- O ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U937 evidenciou que algumas linhagens de *Y. frederiksenii* apresentaram uma elevada capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos, sendo capazes de sobreviver à resposta imune do hospedeiro;
- Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a existência de mecanismos de virulência alternativos aos mecanismos clássicos descritos para *Y. enterocolitica* patogênica;
- A presença de possíveis novos mecanismos de virulência não pode ser verificada, uma vez que a plataforma 454 GS Junior (Roche) não se mostrou adequada para a realização de sequenciamento de RNA de amostras provenientes de interações com células devido à baixa cobertura obtida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSIC, S. et al. *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 327-332, 1987.

BABUJEE, L. et al. Transcriptome changes associated with anaerobic growth in *Yersinia intermedia* (ATCC29909). **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76567, 2013.

BARZON, L. et al. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 11, p. 7861-84, 2011.

BATZILLA, J.; HEESEMANN, J.; RAKIN, A. The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 7, p. 556-61, 2011.

BENT, Z. W. et al. Transcriptomic Analysis of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B Infecting Murine Macrophages Reveals New Mechanisms of Extracellular and Intracellular Survival. **Infect Immun**, v. 83, n. 7, p. 2672-85, 2015.

BERCOVIER, H. et al. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like Group X2): a new species of Enterobacteriaceae isolated from aquatic ecosystems. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 166-172, 1984.

_____. *Yersinia kristensenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 219-224, 1980.

BHAGAT, N.; VIRDI, J. S. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 266, n. 2, p. 177-83, 2007.

BISSETT, M. L. et al. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 5, p. 910-2, 1990.

BLOW, N. Transcriptomics: The digital generation. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 239-42, 2009.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 2, p. 257-76, 1997.

_____. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microbes Infect**, v. 1, n. 4, p. 323-33, 1999.

BOTTONE, E. J.; ROBIN, T. *Yersinia enterocolitica*: recovery and characterization of two unusual isolates from a case of acute enteritis. **J Clin Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 341-5, 1977.

BOTZLER, R. G.; WETZLER, T. F.; COWAN, A. B. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*-like organisms isolated from frogs and snails. **Wildl Dis**, v. 4, n. 4, p. 110-5, 1968.

BRENNER, D. J. et al. *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 207-212, 1980.

_____. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 180-194, 1976.

CAFFERKEY, M. T. et al. *Yersinia frederiksenii* infection and colonization in hospital staff. **J Hosp Infect**, v. 24, n. 2, p. 109-15, 1993.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **APMIS**, v. 122, p. 7, 2014.

CARNIEL, E. Chromosomal virulence factors of *Yersinia*: an update. **Contrib Microbiol Immunol**, v. 13, p. 218-24, 1995.

_____. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes Infect**, v. 3, n. 7, p. 561-9, 2001.

CARNIEL, E.; GUILVOUT, I.; PRENTICE, M. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. **J Bacteriol**, v. 178, n. 23, p. 6743-51, 1996.

CATHELYN, J. S. et al. The *RovA* regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many *RovA*-regulated genes were acquired more recently than the core genome. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 189-205, 2007.

CHEYNE, B. M. et al. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. **J Water Health**, v. 8, n. 3, p. 487-99, 2010.

COLLYN, F. et al. YAPI, a new *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity island. **Infect Immun**, v. 72, n. 8, p. 4784-90, 2004.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **Int J Plant Genomics**, v. 2008, p. 619832, 2008.

CORNELIS, G. R. et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 4, p. 1315-52, 1998.

CULLUM, R.; ALDER, O.; HOODLESS, P. A. The next generation: using new sequencing technologies to analyse gene regulation. **Respirology**, v. 16, n. 2, p. 210-22, 2011.

DELOR, I.; CORNELIS, G. R. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. **Infect Immun**, v. 60, n. 10, p. 4269-77, 1992.

DELOR, I. et al. Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. **Infect Immun**, v. 58, n. 9, p. 2983-8, 1990.

DEMARTA, A. et al. Molecular typing of *Yersinia frederiksenii* strains by means of 16s rDNA and gyrB genes sequence analyses. **FEMS Microbiol Lett**, v. 238, n. 2, p. 423-8, 2004.

DENOEUDE, F. et al. Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing. **Genome Biol**, v. 9, n. 12, p. R175, 2008.

DOLINA, M.; PEDUZZI, R. Population genetics of human, animal, and environmental *Yersinia* strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 2, p. 442-50, 1993.

DROEGE, M.; HILL, B. The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. **J Biotechnol**, v. 136, n. 1-2, p. 3-10, 2008.

DRUMMOND, N. et al. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathog Dis**, v. 9, n. 3, p. 179-89, 2012.

EWING, W. H. et al. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 27, n. 1, p. 37-44, 1978.

FALCÃO, J. P. et al. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersiniae* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **J Appl Microbiol**, v. 96, n. 6, p. 1230-6, 2004.

_____. Panoramic view of the occurrence of *Yersinia* species other than *Y. pestis* in Brazil. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 16, 2008.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 2006.

FALCÃO, J. P. et al. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 11, p. 1539-48, 2006.

FALCÃO, J. P.; SOUZA, R. A. Gênero *Yersinia*. In: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6ª. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 44, p.361-374. (Bacteriologia Médica).

FANTASIA, M. et al. Characterisation of *Yersinia* species isolated from a kennel and from cattle and pig farms. **Vet Rec**, v. 132, n. 21, p. 532-4, 1993.

FERNÁNDEZ, L. et al. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 7, p. 2233-43, 2002.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia* species. **UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology**, v. 64, p. 17, 1987.

FRAZÃO, M. R.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 118, n. 4, p. 1058-67, 2015.

FREDRIKSEN, W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("*Bacterium enterocoliticum*" and *Pasteurella* X). Proceedings of the 14th Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, 1964, Oslo, Norway. p.103-104.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: SIMJEE, S. (Ed.). **Infection Disease: Foodborne Diseases**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007. p.p. 79-113.

FUKUSHIMA, H.; GOMYODA, M.; KANEKO, S. Mice and moles inhabiting mountainous areas of Shimane Peninsula as sources of infection with *Yersinia pseudotuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 11, p. 2448-55, 1990.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 30, n. 1, p. 24-32, 2012.

GRANT, T.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. **Infect Immun**, v. 66, n. 3, p. 1113-20, 1998.

_____. Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4367-75, 1999.

HEUSIPP, G.; YOUNG, G. M.; MILLER, V. L. HreP, an in vivo-expressed protease of *Yersinia enterocolitica*, is a new member of the family of subtilisin/kexin-like proteases. **J Bacteriol**, v. 183, n. 12, p. 3556-63, 2001.

HURST, M. R. et al. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 4, p. 844-9, 2011.

IBRAHIM, A. et al. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1636-8, 1997.

IBRAHIM, A.; LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by colony hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-dUTP-labelled probe. **Mol Cell Probes**, v. 6, n. 2, p. 163-71, 1992.

IMELFORT, M.; EDWARDS, D. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. **Brief Bioinform**, v. 10, n. 6, p. 609-18, 2009.

JOUTSEN, S. et al. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from a hunted wild alpine ibex. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 3, p. 612-7, 2013.

KIM, D. et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biol**, v. 14, n. 4, p. R36, 2013.

KNAPP, W.; THAL, E. Diferenciación de *Yersinia enterocolitica* by biochemical reactions. **Contrib. Microbiol Immunol.**, v. 2, p. 10-16, 1973.

KOHLMANN, A.; GROSSMANN, V.; HAFERLACH, T. Integration of next-generation sequencing into clinical practice: are we there yet? **Semin Oncol**, v. 39, n. 1, p. 26-36, 2012.

KORBEL, J. O. et al. Systematic prediction and validation of breakpoints associated with copy-number variants in the human genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 24, p. 10110-5, 2007.

KOT, B.; TRAFNY, E. A. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. **Pol J Vet Sci**, v. 7, n. 1, p. 27-31, 2004.

KRAUSHAAR, B. et al. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an *ail* gene. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 4, p. 997-1005, 2011.

KUZNETSOV, V. G.; TIMCHENKO, N. F. [Interactions between bacteria of the genus *Yersinia* in a water environment]. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, n. 6, p. 26-9, 1998.

KWAGA, J.; IVERSEN, J. O.; MISRA, V. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 10, p. 2668-73, 1992.

LANGELAND, G. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in drinking water and sewage sludge. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B**, v. 91, n. 3, p. 179-85, 1983.

LEO, J. C.; SKURNIK, M. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. **Adv Exp Med Biol**, v. 715, p. 1-15, 2011.

MA, Q. C.; ENNIS, C. A.; APARICIO, S. Opening Pandora's Box--the new biology of driver mutations and clonal evolution in cancer as revealed by next generation sequencing. **Curr Opin Genet Dev**, v. 22, n. 1, p. 3-9, 2012.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, v. 24, n. 3, p. 133-41, 2008.

MARGUERAT, S.; WILHELM, B. T.; BÄHLER, J. Next-generation sequencing: applications beyond genomes. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 5, p. 1091-6, 2008.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-80, 2005.

MARTIN, L. et al. Characterization of atypical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 8, p. 2377-80, 2009.

MASHAYEKHI, F.; RONAGHI, M. Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry. **Anal Biochem**, v. 363, n. 2, p. 275-87, 2007.

MASSA, S. et al. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from river water. **Zentralbl Mikrobiol**, v. 143, n. 8, p. 575-81, 1988.

MCNALLY, A. et al. *Yersinia enterocolitica* isolates of differing biotypes from humans and animals are adherent, invasive and persist in macrophages, but differ in cytokine secretion profiles in vitro. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 12, p. 1725-34, 2006.

_____. An aflagellate mutant *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain displays altered invasion of epithelial cells, persistence in macrophages, and cytokine secretion profiles in vitro. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 5, p. 1339-49, 2007.

MERHEJ, V. et al. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 4, p. 779-84, 2008..

MILLER, V. L.; FALKOW, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 56, n. 5, p. 1242-8, 1988.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255-64, 2008.

MORRIS, J. G. et al. *Yersinia enterocolitica* isolated from two cohorts of young children in Santiago, Chile: incidence of and lack of correlation between illness and proposed virulence factors. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 12, p. 2784-8, 1991.

MURROS-KONTIAINEN, A. et al. *Yersinia nurmii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 10, p. 2368-72, 2011.

_____. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 10, p. 2363-7, 2011.

MUTZ, K. O. et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Curr Opin Biotechnol**, v. 24, n. 1, p. 22-30, 2013.

NAKAJIMA, H. et al. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 9, p. 2484-6, 1992.

NEUBAUER, H. et al. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. **Int J Med Microbiol**, v. 290, n. 1, p. 61-4, 2000.

_____. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. **Syst Appl Microbiol**, v. 23, n. 1, p. 58-62, 2000.

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D. Strains of *Yersinia wautersii* should continue to be classified as the 'Korean Group' of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex and not as a separate species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. Pt 2, p. 732-3, 2015.

NICOLLE, P.; MOLLARET, H. H.; BRAULT, J. New results on the phage typing of *Yersinia enterocolitica*, concerning more of 4 000 strains of various origins. **Rev Epidemiol Sante Publique**, v. 24, n. 6, p. 479-96, 1976.

NOBLE, M. A. et al. Clinical significance of virulence-related assay of *Yersinia* species. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 5, p. 802-7, 1987.

NOWROUSIAN, M. Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 9, p. 1300-10, 2010.

PAIXÃO, R. et al. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 769097, 2013.

RATNAM, S. et al. A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype 0:5, biotype 1. **J Infect Dis**, v. 145, n. 2, p. 242-7, 1982.

REVELL, P. A.; MILLER, V. L. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. **FEMS Microbiol Lett**, v. 205, n. 2, p. 159-64, 2001.

ROBINS-BROWNE, R.; CIANCIOSI, S.; MORRIS, J. G. Evaluation of different techniques for detection of virulence in *Yersinia enterocolitica*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 9, p. 2159, 1990.

ROBINS-BROWNE, R. M. *Yersinia enterocolitica*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R., et al (Ed.). **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C.: ASM Press, 2001. cap. 11, p.192-211.

ROBINS-BROWNE, R. M. et al. Pathogenicity of *Yersinia kristensenii* for mice. **Infect Immun**, v. 59, n. 1, p. 162-7, 1991.

_____. Evaluation of DNA colony hybridization and other techniques for detection of virulence in *Yersinia* species. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 4, p. 644-50, 1989.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res**, v. 11, n. 1, p. 3-11, 2001.

RUHLE, C.; HÖLLER, C.; GUNDERMANN, K. O. Quantitative and qualitative studies of *Yersinia* species in the waste water of a purification plant. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v. 189, n. 4, p. 285-99, 1990.

SACHDEVA, P.; VIRDI, J. S. Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. **FEMS Microbiol Lett**, v. 240, n. 2, p. 193-201, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSUEL, W. D. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3th. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SAVIN, C. et al. The Yersinia pseudotuberculosis complex: characterization and delineation of a new species, Yersinia wautersii. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 3-4, p. 452-63, 2014.

SCHIEMANN, D. A. The pathogenicity of Yersinia enterocolitica for piglets. **Can J Vet Res**, v. 52, n. 3, p. 325-30, 1988.

SCHRIEFER, M. E.; PETERSEN, J. M. Yersinia. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C., et al (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10th. Washington, D.C.: ASM Press, v.1, 2011. cap. 36, p.627-638.

SCHUBERT, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. Ferric enterochelin transport in Yersinia enterocolitica: molecular and evolutionary aspects. **J Bacteriol**, v. 181, n. 20, p. 6387-95, 1999.

SHAYEGANI, M. et al. Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. **J Clin Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 304-12, 1981.

SHOKRALLA, S. et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Mol Ecol**, v. 21, n. 8, p. 1794-805, 2012.

SIHVONEN, L. M. et al. The ail gene is present in some Yersinia enterocolitica biotype 1A strains. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 3, p. 455-7, 2011.

SODEINDE, O. A. et al. A surface protease and the invasive character of plague. **Science**, v. 258, n. 5084, p. 1004-7, 1992.

SOLTAN-DALLAL, M. M.; MOEZARDALAN, K. Frequency of Yersinia species infection in paediatric acute diarrhoea in Tehran. **East Mediterr Health J**, v. 10, n. 1-2, p. 152-8, 2004.

SOUZA, R. A.; FALCÃO, D. P.; FALCÃO, J. P. Emended description of Yersinia massiliensis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 5, p. 1094-7, 2011.

SPRAGUE, L. D.; NEUBAUER, H. Yersinia aleksiciae sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, n. Pt 2, p. 831-5, 2005.

SPRAGUE, L. D. et al. Yersinia similis sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 4, p. 952-8, 2008.

STASULLI, N. M. et al. Spatially Distinct Neutrophil Responses within the Inflammatory Lesions of Pneumonic Plague. **MBio**, v. 6, n. 5, 2015.

SULAKVELIDZE, A. Yersiniae other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes Infect**, v. 2, n. 5, p. 497-513, 2000.

SULAKVELIDZE, A. et al. Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a recently identified *Yersinia enterocolitica*-like species. **Infect Immun**, v. 67, n. 2, p. 968-71, 1999.

TENNANT, S. M.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 127-37, 2003.

TENNANT, S. M. et al. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6860-7, 2005.

THOERNER, P. et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 3, p. 1810-6, 2003.

TRAPNELL, C. et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 1, p. 46-53, 2013.

URSING, J.; ALEKSIĆ, S. *Yersinia frederiksenii*, a genotypically heterogeneous species with few differential characteristics. **Contrib Microbiol Immunol**, v. 13, p. 112-6, 1995.

URSING, J. et al. *Yersinia frederiksenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 213-217, 1980.

VAN LOGHEM, J. J. The classification of plague-bacillus. **Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.**, v. 10, p. 15, 1944.

VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annu Rev Microbiol**, v. 59, p. 69-89, 2005.

VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 641-58, 2009.

WANG, R. L. et al. DNA microarray application in ecotoxicology: experimental design, microarray scanning, and factors affecting transcriptional profiles in a small fish species. **Environ Toxicol Chem**, v. 27, n. 3, p. 652-63, 2008.

WAUTERS, G. Contribution de l'étude de *Yersinia enterocolitica* thesis 'd'agregé'. **Universit Catholique de Louvain**, 1970.

_____. Correlation between ecology, biochemical behavior and antigenic properties of *Yersinia enterocolitica*. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 2, p. 38-41, 1973.

WAUTERS, G. et al. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. **Contrib Microbiol Immunol**, v. 12, p. 239-43, 1991.

_____. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 4, p. 5, 1988.

WREN, B. W.; TABAQCHALI, S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. **Lancet**, v. 336, n. 8716, p. 693, 1990.

ZHANG, J. et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. **J Genet Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHENG, H. et al. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 368-74, 2008.

ZHOU, X. et al. The next-generation sequencing technology and application. **Protein Cell**, v. 1, n. 6, p. 520-36, 2010.

ZIEGERT, E.; DIESTERWEG, I. The occurrence of *Yersinia enterocolitica* in sewage. **Zentralbl Mikrobiol**, v. 145, n. 5, p. 367-75, 1990.

APÊNDICES

Apêndice I - Bio-sorogrupo, fonte, local, ano de isolamento e perfil de genes relacionados à virulência das 118 linhagens de *Yersinia* spp. estudadas, incluindo 50 *Y. frederiksenii*, 55 *Y. intermedia* e 13 *Y. kristensenii*, e os controles usados na pesquisa de genes relacionados à virulência, ensaios de adesão e invasão e microscopia eletrônica de varredura

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano	Genes presentes
FCF 1 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:22	Leite	Rio de Janeiro	1980	ND
FCF 162 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:27	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 163	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i>
FCF 168	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:12,25	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i>
FCF 172	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:12,25	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i>
FCF 182	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i>
FCF 183 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:27	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 184 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 187 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i> e <i>ystB</i>
FCF 188	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:25	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 226 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Leite	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 239 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:2,3	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 276 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,29	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ystB</i>
FCF 310 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:66	Queijo	Campinas	1984	ND
FCF 400 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988	ND
FCF 411	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:52	Linguiça	Campinas	1988	ND
FCF 412	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40	Linguiça	Campinas	1988	<i>fepA</i>
FCF 413	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:74	Linguiça	Campinas	1988	<i>fepA</i>
FCF 420	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988	<i>ystB</i>
FCF 423	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Leite	São Paulo	1988	<i>ystB</i>
FCF 427	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Leite	São Paulo	1988	<i>ystB</i>
FCF 434	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Queijo	Rio de Janeiro	1988	<i>fes</i>
FCF 461 *†	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Leite	São Paulo	1990	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 492	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:13,7	Verdura	São Paulo	1991	ND
FCF 493	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:22	Verdura	São Paulo	1991	ND
FCF 497	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Carne	São Paulo	1991	<i>fes</i>
FCF 499	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:60	Carne	São Paulo	1991	<i>fepA</i>
FCF 512	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16a,58	Verdura	São Paulo	1991	<i>ystB</i>

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano	Genes presentes
FCF 513 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Carne	São Paulo	1991	<i>fes</i>
FCF 514 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10,34	Carne	São Paulo	1991	<i>fes</i>
FCF 567	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Ostra	Rio de Janeiro	1997	ND
FCF 573	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:40,74	Ostra	Rio de Janeiro	1997	<i>fepA</i>
FCF 582	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,58	Hambúrguer	Rio de Janeiro	1998	<i>fepA</i>
FCF 585	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:38	Almôndegas	Rio de Janeiro	1998	ND
FCF 592	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:60	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998	<i>fepA</i>
FCF 593	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	NAG	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998	<i>fepA</i>
FCF 596	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:38	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998	<i>fepA</i>
FCF 208 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983	<i>fes</i>
FCF 209	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983	<i>fes</i>
FCF 210	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983	<i>fes</i>
FCF 214 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de nascente	Rio de Janeiro	1983	<i>ystB</i>
FCF 220	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de nascente	Rio de Janeiro	1984	ND
FCF 224	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fes</i>
FCF 341	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de riacho	Rio de Janeiro	1984	ND
FCF 342	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:10	Água de riacho	Rio de Janeiro	1984	ND
FCF 343	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:2,3	Água de lagoa	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i>
FCF 467 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16a,58	Água	Buenos Aires	1990	<i>ystB</i>
FCF 379 *†	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16	Fezes diarreicas de suíno	Londrina	1985	<i>fes</i>
FCF 543 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:74	Fezes diarreicas humana	Ribeirão Preto	1993	<i>fepA</i>
FCF 577 *	<i>Y. frederiksenii</i>	NA	O:16,58	Fezes diarreicas humana	Ribeirão Preto	1997	<i>ystB</i>
IP 8372	<i>Y. intermedia</i>	1	O:7,8	Leite	Rio de Janeiro	1980	<i>ail e fes</i>
FCF 9	<i>Y. intermedia</i>	4	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980	<i>ail e fes</i>
FCF 11 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:18	Leite cru	Rio de Janeiro	1980	<i>ail, fepA e fes</i>
FCF 16 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980	<i>fes</i>
FCF 18	<i>Y. intermedia</i>	2	O:40	Leite cru	Rio de Janeiro	1980	<i>ail e fes</i>
FCF 46	<i>Y. intermedia</i>	1	O:66	Leite cru	Rio de Janeiro	1980	<i>fepA e fes</i>
FCF 175	<i>Y. intermedia</i>	5	O:16	Leite	Rio de Janeiro	1983	<i>ail e fepA</i>
FCF 190 *	<i>Y. intermedia</i>	6	O:14	Leite cru	Campinas	1983	<i>fes</i>

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano	Genes presentes
FCF 191	<i>Y. intermedia</i>	1	O:14	Leite cru	Campinas	1983	<i>fes</i>
FCF 192 *	<i>Y. intermedia</i>	6	O:26	Leite cru	Campinas	1983	<i>fes</i>
FCF 201 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:5,27	Leite pasteurizado	Araraquara	1983	<i>fes</i>
FCF 230	<i>Y. intermedia</i>	1	O:12,25	Carne moída	Araraquara	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 233 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16	Alface	Araraquara	1984	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 234	<i>Y. intermedia</i>	1	O:13,7	Carne moída	Araraquara	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 235	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16,29	Fígado de boi	Araraquara	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 266	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 280	<i>Y. intermedia</i>	1	O:21	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 294	<i>Y. intermedia</i>	1	O:65	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 296	<i>Y. intermedia</i>	1	O:10,34	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 297	<i>Y. intermedia</i>	6	O:17	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 298 *	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 299	<i>Y. intermedia</i>	4	O:13,7	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 301	<i>Y. intermedia</i>	1	O:36	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 402	<i>Y. intermedia</i>	4	O:33	Leite cru	São Paulo	1988	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 421	<i>Y. intermedia</i>	4	O:16	Leite cru	São Paulo	1988	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 456 *	<i>Y. intermedia</i>	4	NAG	Leite pasteurizado	São Paulo	1990	<i>fes</i>
FCF 481 *	<i>Y. intermedia</i>	8	O:14	Leite cru	São Paulo	1991	<i>fes</i>
FCF 498	<i>Y. intermedia</i>	3	O:10,34	Carne	São Paulo	1991	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 508	<i>Y. intermedia</i>	3	O:5,27	Carne	São Paulo	1991	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 509	<i>Y. intermedia</i>	3	O:13,7	Carne	São Paulo	1991	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 511 *	<i>Y. intermedia</i>	5	NAG	Carne	São Paulo	1991	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 563	<i>Y. intermedia</i>	5	O:33	Leite pasteurizado	São Paulo	1997	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 584 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:16,58	Almôndegas	Rio de Janeiro	1998	<i>fes</i>
FCF 591	<i>Y. intermedia</i>	1	O:38	Cortes de frango	Rio de Janeiro	1998	<i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 84	<i>Y. intermedia</i>	1	O:4,32	Água	São Paulo	1982	<i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 128	<i>Y. intermedia</i>	4	O:4,32	Água de esgoto	São Paulo	1982	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 134 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:40	Água de esgoto	São Paulo	1982	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 204 *	<i>Y. intermedia</i>	4	O:16	Água do mar	Rio de Janeiro	1983	<i>fes</i>

Continua

Continuação

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano	Genes presentes
FCF 207	<i>Y. intermedia</i>	1	O:18	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1983	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 219 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:37	Água de cachoeira	Rio de Janeiro	1984	<i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 222 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:33	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fes</i>
FCF 242	<i>Y. intermedia</i>	4	O:7,8	Água	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 243	<i>Y. intermedia</i>	1	O:13,7	Água	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 245	<i>Y. intermedia</i>	1	O:10	Água	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 246	<i>Y. intermedia</i>	1	O:14	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 250 *	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 317	<i>Y. intermedia</i>	1	O:15	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 318	<i>Y. intermedia</i>	1	O:48	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 321 *†	<i>Y. intermedia</i>	1	O:25,35	Água de rio	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fes</i> e <i>tccC</i>
FCF 323	<i>Y. intermedia</i>	4	O:40	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fes</i>
FCF 325 *	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 330	<i>Y. intermedia</i>	1	O:66	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> e <i>fes</i>
FCF 336	<i>Y. intermedia</i>	1	O:4,33	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> e <i>fes</i>
IP 8184	<i>Y. intermedia</i>	1	O:17	Fezes diarreicas de cão	Rio de Janeiro	1980	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
IP 8181 *†	<i>Y. intermedia</i>	1	NAG	Fezes diarreicas humanas	Rio de Janeiro	1980	<i>ail</i> , <i>fepA</i> e <i>fes</i>
FCF 61 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:9	Leite	Campinas	1981	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>
FCF 62 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:9	Leite	Campinas	1981	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>
FCF 238 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 240	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>herP</i> e <i>ystB</i>
FCF 241 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	NAG	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 281	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 282 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Carne	Rio de Janeiro	1984	<i>fepA</i> , <i>fepD</i> e <i>hreP</i>
FCF 410 *†	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11	Linguiça	Campinas	1988	<i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 580 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Ostra	Rio de Janeiro	1998	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 221 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Água de cachoeira	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 324	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:61	Água de estuário poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 326 *	<i>Y. kristensenii</i>	NA	O:11,24	Água de rio poluído	Rio de Janeiro	1984	<i>ail</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>hreP</i> e <i>ystB</i>
FCF 604 *†	<i>Y. kristensenii</i>	NA	NAG	Fezes de capivara	Botucatu	1998	<i>fepD</i> , <i>fes</i> e <i>ystB</i>

Continua

Conclusão

Linhagens	Espécies	Biogrupo	Sorogrupo	Fonte	Local	Ano	Genes presentes
8081	<i>Y. enterocolitica</i>	1B	O:8	NA	NA	NA	NA
FCF 60	<i>Y. enterocolitica</i>	4	O:3	Fezes diarreicas humanas	Recife	1981	NA
FCF 119	<i>Y. enterocolitica</i>	1A	O:27	Água de esgoto	São Paulo	1982	NA
IP 6884	<i>Y. enterocolitica</i>	1A	O:7,8	Roedor	Chile	1978	NA

NA – não se aplica; NAG – não aglutinável; ND – não detectado; * Linhagens selecionadas para os ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 após 24 horas de incubação; † Linhagens selecionadas para condições adicionais dos ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 após cinco e 12 dias de incubação e HEp-2 após 48 horas de incubação e microscopia eletrônica.

Anexo I - Meio de cultura EPM**- Base A:**

Triptona (Himedia)	10,0 g
Extrato de carne (BBL)	2,0 g
Cloreto de sódio (Merck)	5,0g
Fosfato de sódio dibásico pentahidratado (Merck)	2,0 g
L-triptofano (Difco)	1,0 g
Sol. alcoólica de azul de bromotimol 1,5% (Merck)	2,0 mL
Ágar (Acumedia)	12,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Todos os constituintes foram adicionados à água, com exceção do ágar e da solução de azul de bromotimol. O pH do meio foi ajustado para 7,4. Acrescentou-se o ágar e aqueceu-se até completa dissolução. Em seguida foi acrescentada a solução de azul de bromotimol e o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Solução B:

Citrato de ferro amoniacal (Merck)	2,0 g
Tiosulfato de sódio pentahidratado (Merck)	2,0 g
Glicose (Reagen)	10,0 g
Ureia (Difco)	10,0 g
Água destilada	85,0 mL

Os componentes foram dissolvidos em banho de água a 65°C e mantidos neste banho durante 1 hora. Após isso, a solução foi armazenada em frasco âmbar.

- Preparo do meio EPM:

Base A	1000,0 mL
Solução B	17,5 mL

A base A e a solução B foram misturadas assepticamente e 4,5 mL do meio foram distribuídos em tubos de vidro, que foram inclinados de maneira a se obter uma base de, pelo menos, 2,5 cm.

Anexo II - Meio de cultura MILi

Extrato de levedura (Difco)	3,0 g
Peptona (Difco)	10,0 g
Tryptona (Himedia)	10,0 g
L-lisina (Synth)	10,0 g
Glicose (Reagen)	1,0 g
Ágar (Acumedia)	2,0 g
Sol. púrpura de bromocresol 1,0% (Merck)	1,25 mL
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Todos os constituintes foram adicionados à água, com exceção do ágar e da solução púrpura de bromocresol. O pH do meio foi ajustado para 6,5. Então o ágar foi adicionado e o meio foi aquecido até completa dissolução. Em seguida a solução púrpura de bromocresol foi acrescentada e o meio foi distribuído em tubos de vidro e esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.