UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A de origens diversas

Fábio Campioni

**Ribeirão Preto
2009**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A de origens diversas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Fábio Campioni

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

**Ribeirão Preto
2009**

RESUMO

CAMPIONI, F. **Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A de origens diversas.** 2009. 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

Entre as 12 espécies do gênero *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica* é a mais prevalente como causa de doença em humanos e animais. Sua patogenicidade é relacionada, entre outras características, a seis biotipos: o 1B e os biotipos 2 a 5 comprovadamente patogênicos e o biotipo 1A, considerado como não-patogênico. Entretanto, dados da literatura relatam linhagens do biotipo 1A como sendo os agentes causais de infecções em humanos e animais. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial patogênico e verificar a similaridade genômica de linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, isoladas de material clínico e não-clínico. Foram estudadas 52 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A isoladas de humanos (11), animais (11), alimentos (15) e ambiente (15), quanto a susceptibilidade a antimicrobianos, comportamento frente a testes fenotípicos relacionados à virulência, resistência a reativos intermediários do oxigênio, invasão a células HEp-2 e Caco-2, presença de genes de virulência por PCR e similaridade genômica por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR) e *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Tanto as linhagens clínicas como as não-clínicas apresentaram resistência à ampicilina e à cefalotina. Não foi observada diferença entre linhagens de origem clínica e não-clínica frente aos testes de fermentação da salicina, hidrólise da esculina, atividade da pirazinamidase, reativos intermediários do oxigênio e invasão a células HEp-2. Entretanto, linhagens de origem não-clínica foram mais invasivas a células Caco-2 do que as de origem clínica. Oito dos 11 genes de virulência pesquisados foram encontrados. Os genes *ystB*, *hreP* e *fepD* foram mais frequentemente detectados em linhagens de origem clínica. Ao contrário, os genes *myfA*, *fepA*, *fes* e *tccC* apresentaram-se mais frequentes nas linhagens de origem não-clínica. Entretanto, a diferença na frequência de tais genes não foi estatisticamente significativa entre linhagens clínicas e não-clínicas. O gene *inv* foi detectado em todas as linhagens estudadas, entretanto, os genes *ail*, *ystA* e *virF* não foram detectados em nenhuma das 52 linhagens. O dendrograma de similaridade genômica consenso das técnicas de ERIC-PCR e PFGE, permitiu a visualização de dois grupos (A e B). Foi observada uma alta similaridade genômica (>63%) entre quase todas as linhagens isoladas de humanos e animais, bem como uma alta similaridade genômica para a maioria das linhagens de origem clínica e não-clínica (>58%). O índice de discriminação de ERIC-PCR foi 0,98, e o de PFGE foi 0,99. Entre as linhagens do biotipo 1A estudadas, não foi observada diferença entre o potencial patogênico de linhagens de origem clínica e não-clínica frente aos testes fenotípicos realizados e prevalência de genes de virulência pesquisados. A exceção foi o teste de invasão a células Caco-2, onde as linhagens não-clínicas foram mais invasivas. As técnicas de ERIC-PCR e PFGE discriminaram similarmente as linhagens estudadas. A alta similaridade genômica entre as linhagens de origem clínica e não-clínica evidencia os animais como sendo importantes reservatórios de *Y. enterocolitica* biotipo 1A e sugere que isolados de ambiente e alimentos tem sido fonte de contaminação de humanos e animais.

Palavras-Chaves: *Yersinia enterocolitica*; Biotipo 1A; Potencial patogênico; ERIC-PCR; PFGE.

ABSTRACT

CAMPIONI, F. **Molecular typing and pathogenic potential characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains of diverse origins.** 2009. 84f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

Among the 12 species of the genus *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica* is the most prevalent cause of illness in humans and animals. Among other characteristics, its pathogenicity is related to six biotypes: 1B and 2 to 5 considered pathogenic and the 1A biotype considered non-pathogenic. Despite being defined as non-pathogenic, literature has been shown that biotype 1A strains may be the etiological agents of infections in humans and animals. The aim of this work was to investigate the pathogenic potential and to verify the genomic similarity of *Y. enterocolitica* biotype 1A isolated from clinical and non-clinical sources. Fifty-two strains of *Y. enterocolitica* biotype 1A isolated from humans (11), animals (11), food (15), and environment (15) were analyzed regarding their susceptibility to antimicrobials, behavior against phenotypic tests related to virulence, resistance to oxygen intermediate reactives, invasion to HEP-2 and Caco-2 cells, presence of virulence genes by PCR, and genomic similarity by *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR) and *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Both clinical and non-clinical strains showed resistance to ampicillin and cephalothin. It was not observed any difference in the pathogenic potential between clinical and non-clinical strains face of the following tests: salicine fermentation, esculin hydrolysis, pirazinamidase activity, oxygen intermediate reactives and HEP-2 cell invasion assay. On the other hand, the non-clinical strains were more invasive to Caco-2 cells than the clinical ones. Eight of 11 studied virulence genes were found. Genes *ystB*, *hreP* and *fepD* were more often detected in clinical strains. In contrast, *myfA*, *fepA*, *fes* and *tccC* were presented more frequently in non-clinical strains. However, the frequency difference of those genes was not statistically significant between clinical and non-clinical strains. The *inv* gene was detected in all the strains studied; but no *ail*, *ystA*, and *virF* genes were found in any of the 52 strains. ERIC-PCR and PFGE dendrogram allowed the visualization of two groups named A and B. It was observed a high genomic similarity among almost all human and animal isolated strains (>63%), as well as a high genomic similarity between the clinical and non-clinical strains (>58%). The discriminatory index for ERIC-PCR was 0.98 and for PFGE was 0.99. Among biotype 1A strains no difference was observed between the pathogenic potential of clinical and non-clinical strains face to the phenotype tests employed, and regarding the prevalence of the studied virulence genes. The exception was the Caco-2 cells invasion assay where non-clinical strains were more invasive., ERIC-PCR and PFGE discriminated the studied strains similarly. The high genomic similarity between the clinical and non-clinical strains gives evidence that animals constitute important reservoirs of *Y. enterocolitica* biotype 1A and suggests that environmental and food isolates have been the source of human and animal infections.

Key-words: *Yersinia enterocolitica*; Biotype 1A; pathogenic potential; ERIC-PCR; PFGE.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Yersinia*

O gênero *Yersinia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é atualmente composto por 12 espécies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. ruckeri*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretti*, *Y. bercovieri* e *Y. aleksiceae* (WANGER, 2007).

Historicamente, o gênero *Yersinia* foi proposto em 1944 por Van Loghem que sugeriu que um novo gênero deveria ser formado para agregar os organismos *Pasteurella pestis* e *Pasteurella pseudotuberculosis* que estavam incluídos no gênero *Pasteurella*, mas possuíam características fenotípicas e genotípicas diferenciadas das demais espécies daquele gênero. Dessa forma, criou-se o gênero *Yersinia* em homenagem ao bacteriologista francês Alexander J. Yersin por ter isolado o agente da peste negra pela primeira vez em 1894, durante a terceira grande pandemia. Em 1964 o então *Bacterium enterocolitica*, descrito em 1939 após relatos de surtos de gastroenterite, foi renomeado por Frederiksen como *Yersinia enterocolitica*, espécie que mais adiante foi subdividida em grupos cujos microrganismos eram designados organismos *Y. enterocolitica-like*. Na década de 1980, após intensos estudos taxonômicos baseados na fermentação de carboidratos e hibridização DNA-DNA, viu-se que os representantes desses subgrupos eram na verdade quatro novas espécies que foram designadas *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. aldovae*. Subseqüentes designações de espécies incluíram *Y. ruckeri*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretti* e *Y. bercovieri* no gênero (SULAKVELIDZE, 2000; FALCÃO; FALCÃO, 2006; WANGER, 2007).

O mais novo membro do gênero é *Y. aleksiceae*, previamente incluída como representante de *Y. kristensenii* e que foi diferenciada dessas pelas técnicas de hibridização DNA-DNA, por uma seqüência específica do gene 16S rRNA e pela atividade da enzima lisina descarboxilase (SPRAGUE; NEUBAUER, 2005). *Yersinia ruckeri* foi a primeira dessas bactérias a ser descrita (EWING et al., 1978).

Embora a maioria das espécies do gênero tenha sido isolada de humanos, com exceção de *Y. aldovae*, as únicas espécies que são comprovadamente patógenos de humanos são *Y. pestis*, causadora da praga, *Y. pseudotuberculosis* causadora de linfadenite mesentérica e septicemia e *Y. enterocolitica* causadora principalmente de uma síndrome gastrointestinal que pode variar de uma enterite

aguda a uma linfadenite mesentérica. Essas espécies mais *Y. ruckeri*, que é a causa da doença da “boca vermelha” em peixes, são os únicos membros do gênero considerados patogênicos para animais. Todas as outras espécies são consideradas, sobretudo como não-patogênicas e ambientais (SULAKVELIDZE, 2000; FALCÃO; FALCÃO, 2006; WANGER, 2007).

1.2 *Yersinia enterocolitica*

1.2.1 Características do microrganismo

Entre as espécies de *Yersinia*, a *Y. enterocolitica* é a mais prevalente como causa de doenças em humanos e animais (BOTTONNE, 1999; ROBINS-BROWNE, 2001; FALCÃO et al., 2006).

Yersinia enterocolitica, assim como os outros membros do gênero, é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, móvel a temperatura ambiente (25°C), devido à presença de flagelos peritríquios ou peripolares, porém imóvel a 37°C. As exceções são *Y. pestis* que é imóvel e *Y. ruckeri* que apresenta motilidade variável. Seu tamanho, de 0,5 a 0,8 µm de diâmetro por 1 a 3 µm de comprimento, é menor do que o de outros membros da família *Enterobacteriaceae*. É um microrganismo anaeróbio facultativo e psicotrófico, pois tem a capacidade, incomum entre as enterobactérias, de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura que varia de 4 a 43°C, porém a temperatura ótima para multiplicar-se *in vitro* é entre 25 e 28°C. Resiste bem ao congelamento, e pode viver em alimentos congelados, mas é sensível ao calor, sendo destruída por pasteurização a 71,8°C por 30 minutos. *Y. enterocolitica* multiplica-se bem em meios com altas concentrações de sais biliares como o ágar cefsulodina-irgasan-novobiocina (CIN), ágar MacConkey e ágar *Salmonella-Shigella* (SS), apresentando colônias arredondadas, opacas, incolores e que medem cerca de 1mm de diâmetro (HOLT et al., 1994; WANGER, 2007).

Y. enterocolitica é altamente heterogênea, sendo dividida em subtipos, principalmente de acordo com a sua atividade bioquímica frente a determinados substratos e diversidade de antígenos somáticos, o que possibilita diferenciar as linhagens dessa espécie em diversos bio-sorotipos (ROBINS-BROWNE, 2001).

Existem seis biotipos de *Yersinia enterocolitica*, conforme descrito por Wanger (2007): o biotipo 1 que é subdividido em 1A e 1B e os biotipos 2 a 5. A maioria das linhagens patogênicas para humanos e animais são dos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5,

enquanto aquelas isoladas sobretudo do meio ambiente e consideradas não-patogênicas, enquadram-se no biotipo 1A (ROBINS-BROWNE, 2001; FALCÃO; FALCÃO, 2006).

O esquema antigênico de *Y. enterocolitica* é compartilhado com outras espécies do gênero, exceto por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. Esse inclui 76 sorogrupos somáticos e 44 antígenos flagelares. No entanto, rotineiramente somente os antígenos somáticos são caracterizados, pois os flagelares não tem importância prática para o propósito de diagnóstico em laboratórios de rotina. Os sorogrupos mais relacionados com doenças no homem são o O:3, O:5,27, O:8 e O:9 (ALEKSIC et al., 1986; FALCÃO; FALCÃO, 2006).

Ademais, baseando-se na hibridização DNA-DNA e seqüenciamento do gene 16S rRNA, *Y. enterocolitica* pode ser dividida em duas subespécies sendo estas denominadas *Y. enterocolitica* subespécie *paleartica*, que inclui linhagens de origem européia pertencentes aos bio-sorogrupos 4/O:3, 2/O:9, 3/O:5,27, 1A/O:7,8, 1A/O:6,30 e 1A/O:5, e *Y. enterocolitica* subespécie *enterocolitica*, que inclui linhagens de origem americana pertencentes aos bio-sorogrupos 1B/O:8, 1B/O:13, 1B/O:18, 1B/O:20, 1B/O:21 e 1A/O:7,8 (SACHDEVA; VIRDI, 2004).

1.2.2 Patogênese e Manifestações Clínicas

A descrição da patogenia de *Y. enterocolitica* feita por Hartland e Robins-Browne(1998) e por Robins-Browne (2001), mostrou que esse microrganismo é um patógeno invasivo que induz uma resposta inflamatória nos tecidos infectados, sendo o íleo distal e em particular o tecido linfóide intestinal os principais alvos da infecção, embora regiões intestinais adjacentes e os linfonodos mesentéricos sejam também envolvidos com frequência.

A entrada de *Y. enterocolitica* no trato gastrointestinal ocorre após a ingestão de água ou alimentos contaminados. Após a ingestão, *Y. enterocolitica* em sua maioria permanece no lúmen intestinal enquanto uma minoria adere ao epitélio da mucosa, não mostrando preferência particular por qualquer tipo de célula. As bactérias que invadem o tecido, o fazem através das células M, que são células epiteliais especializadas localizadas sobre folículos linfóides no intestino. Após a penetração, as bactérias atravessam a membrana basal e se proliferam nos tecidos linfóides associados ao intestino e na lâmina própria, onde causam destruição tecidual localizada levando à formação de microabcessos. *Y. enterocolitica* também

pode se espalhar através da lâmina própria para vilosidades adjacentes e se espalhar para outros locais pela corrente linfática (ROBINS-BROWNE, 2001).

As manifestações clínicas de *Y. enterocolitica* são caracterizadas por sua grande variedade. Embora a maioria das infecções sintomáticas resultem em uma diarreia auto-limitada, yersinioses podem também acarretar em complicações supurativas e auto-imunes. O grau dessas complicações é determinado por fatores do hospedeiro, em particular idade e estado do sistema imune, sendo as crianças menores de cinco anos de idade as mais susceptíveis a infecções por esta bactéria. Nesses pacientes, a yersiniose se apresenta usualmente como diarreia variando de aquosa a mucóide e em um pequeno percentual de casos sanguinolenta, geralmente acompanhada de febre baixa e dores abdominais (ROBINS-BROWNE, 2001).

1.2.3 Fatores de Virulência

Para que *Yersinia enterocolitica* possa causar doença, é necessário um conjunto de atributos ou fatores de virulência que são codificados tanto por genes plasmidiais contidos no plasmídio de virulência pYV, como por genes cromossomais. A expressão desses genes é temperatura-dependente, isto é, os genes plasmidiais são expressos a 37°C e os cromossomais usualmente a 25°C (ROBINS-BROWNE, 2001).

Entre os genes cromossomais de virulência, que foram identificados e bem caracterizados, estão os relacionados com a síntese de lipopolissacarídeos (LPS), produção de urease, síntese de fímbrias, adesão e invasão de células eucarióticas, produção de enterotoxina, entre outros (CARNIEL, 1995).

A produção de urease é um determinante de virulência de várias bactérias intestinais, pois facilita sua passagem através do estômago permitindo que a bactéria escape da barreira ácida estomacal. A tolerância ácida reside no fato de que a bactéria produz urease que catalisa a produção de amônia a partir da uréia, permitindo que esta resista a pHs baixos como o do estômago que é pH 2,5 (ROBINS-BROWNE, 2001).

O lipopolissacarídeo (LPS) é afetado por temperaturas elevadas, pois ocorrem alterações na composição de seus açúcares e ácidos graxos a 35-37°C. Células multiplicando-se a 25°C possuem um LPS liso e expressam a cadeia completa do antígeno somático (O), enquanto células crescendo a 37°C são rugosas

devido à repressão da síntese do polissacarídeo. O LPS liso pode estimular a virulência por aumentar a hidrofobicidade e, dessa maneira, facilitar a passagem da bactéria através do muco que forra o epitélio intestinal. Por outro lado, o LPS liso por apresentar cadeias alongadas somáticas (O), pode ocultar proteínas de superfície associadas à virulência tais como Ail e YadA, requeridas numa fase tardia da infecção. A repressão da síntese do LPS a 37°C pode aumentar as chances da bactéria sobreviver nos tecidos, permitindo-lhe expor na superfície seus determinantes de virulência no período apropriado da infecção (PIERSON, 1994).

Y. enterocolitica à temperatura de 25°C expressa fímbrias, codificadas pelo gene *myf*, que participam da aderência da bactéria ao epitélio intestinal. As fímbrias são produzidas na superfície e são denominadas Myf (*mucoide Yersinia fibrillae*) por conferirem aspecto mucóide às colônias bacterianas que as expressam. 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).

À temperatura de 25°C, é produzida por *Y. enterocolitica* em sua membrana externa, uma proteína de invasão denominada invasina (Inv), de 92 kDa. 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 invadir “*in vitro*” células HeLa (células epiteliais de adenocarcinoma cervical humano), HEp-2 (células epiteliais de carcinoma de laringe) e Henle 407 (células epiteliais de intestino humano). Essa proteína é quem inicia diretamente a penetração da bactéria na célula alvo, pela ligação a receptores denominados β -integrinas. Em células epiteliais essa interação promove modificação 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*, que codifica Inv, existe no cromossomo de todas as linhagens de *Y. enterocolitica*, mas é funcional apenas nas sorovariedades patogênicas, indicando 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, de 17kDa, codificada pelo gene cromossomal *ail* (*adhesion/invasion loccus*). Esta é uma proteína de membrana externa, sem qualquer homologia com Inv, expressa nas linhagens dos biotipos 1B e 2 a 5 de *Y. enterocolitica*. Já as linhagens do biotipo 1A isoladas de humanos ou do

meio ambiente usualmente não possuem o gene *ail*. *Ail* media adicionalmente a resistência ao efeito bactericida do complemento (ROBINS-BROWNE, 2001).

O ferro é um fator essencial para o crescimento e sobrevivência dos microrganismos. 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. Embora as espécies patogênicas de *Yersinia* não produzam sideróforos das classes catecolato e hidroxamato, essas possuem eficientes sistemas de captura de tais sideróforos. 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; HEESEMANN, 1999).

Yersinia enterocolitica patogênicas podem secretar uma enterotoxina termoestável (Yst ou YstA), codificada pelo gene *ystA*, cuja porção carboxi-terminal é homóloga à enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxigênica, de *Citrobacter freundii* e de *Vibrio cholera* não O1 (ROBINS-BROWNE, 2001). A YstA é produzida em temperaturas inferiores a 30°C, portanto pode não ser expressa “*in vivo*”, mas 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). Resultados recentes sugerem que esta toxina também pode ser expressa a 37°C em meio com alta osmolaridade e pH similares ao do lúmen intestinal (ROBINS-BROWNE, 2001).

Além dos genes cromossomais de virulência clássicos como *inv*, *ail*, *ystA*, *myf* e do gene plasmidial *virF*, encontrados mais freqüentemente nos biotipos 1B, 2 a 5, outros genes demonstraram estar associados à virulência, principalmente de

linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A, como os genes *ystB*, *hreP* e *tccC* (BHAGAT; VIRDI, 2007).

A proteína denominada YstB, codificada pelo gene *ystB*, é uma enterotoxina que 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 somente *in vitro* 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; VIRDI, 2007).

O gene *hreP*, codifica a protease HreP. Proteases são conhecidas por contribuírem com a patogenicidade bacteriana por interferirem com proteínas de tecidos do hospedeiro e por inativarem importantes proteínas-chaves na defesa. A importância de HreP na patogênese de *Y. enterocolitica*, foi demonstrada com uma linhagem de *Y. enterocolitica* mutante para o gene *hreP*, o que refletiu na redução da virulência dessa linhagem (HEUSIPP et al., 2001).

Algumas linhagens de *Y. enterocolitica*, principalmente as do biotipo 1A, apresentam o gene *tccC* homólogo ao gene *tc* (inseticidal toxin complex) de *Photobacterium luminescens* que permite que essa bactéria sobreviva em insetos. Entretanto, não se sabe ao certo o porquê de linhagens que não vivem em insetos possuírem genes homólogos ao gene *tc*, o que se estende também a *Yersinia enterocolitica*. Acredita-se que em *Yersinia* o gene *tccC* não codifique toxinas inseticidas e sim alguma toxina que contribua para a atividade enterotóxica destas, 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).

Y. enterocolitica pode ainda expressar ou não características fenotípicas como atividade da enzima pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina, sendo estas características relacionadas à virulência (FARMER III et al., 1992). Em trabalhos realizados por Bauab et al., (1991) e por Falcão et al. (2004, 2006), demonstrou-se a correlação entre a expressão dessas características fenotípicas com linhagens dos biotipos patogênicos de *Y. enterocolitica*.

Y. enterocolitica patogênicas dos biotipos 1B e 2 a 5, possuem o plasmídeo pYV que é responsável pela produção da adesina YadA e de outras proteínas denominadas Yops (*Yersinia outer proteins*). A secreção das proteínas Yops ocorre através de uma

maquinaria conhecida como secreção do Tipo III usadas por bactérias Gram-negativas para translocar proteínas bacterianas efetoras diretamente no citoplasma da célula eucariótica hospedeira (CORNELIS et al., 1998; CORNELIS, 2001).

Os efeitos das Yops efetoras nos macrófagos 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 (CORNELIS, 2001). 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 plasmídeo em uma região de 20Kb, chamada cálcio-dependente. Os *loci* transcrpcionais 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 mais importante adesina de *Yersinia*, é a proteína de membrana externa YadA (adesina A de *Yersinia*) produto do gene plasmidial *yadA*, produzida a 37°C. Essa induz a adesão da bactéria ao muco intestinal, colágeno, laminina e fibronectina. O complexo formado permite a ligação a β -integrinas, com conseqüente internalização da bactéria por endocitose. YadA tem a importante função de inibir a resposta imune inata do hospedeiro, conferindo resistência à ação do sistema complemento, com conseqüente inibição da fagocitose, além de inibir o *burst* respiratório (BOTTONE, 1999; SALYERS; WHITT, 2002).

Como características fenotípicas de linhagens de *Yersinia* portadoras do plasmídeo de virulência pYV, observa-se a autoaglutinação a 37°C, aderência a células HEp-2, absorção do corante Vermelho Congo, dependência ao cálcio a 37°C, entre outras. Correlacionando a presença do plasmídeo com essas características fenotípicas, tem-se um conjunto de dados para definir a patogenicidade de *Yersinia* e a capacidade do microrganismo causar doenças em humanos e animais (FARMER III et al., 1992; ROBINS-BROWNE, 2001).

1.2.4 Tratamento e susceptibilidade a antibióticos

As infecções intestinais por *Y. enterocolitica* são normalmente autolimitadas e não necessitam de tratamento específico com antimicrobianos. Em pacientes

imunocomprometidos, a enterite pode ser tratada profilaticamente. Nesses pacientes é recomendada a administração oral de doxiciclina ou trimetoprim-sulfametoxazol, bem como, para pacientes com outras complicações gastrointestinais e infecções extraintestinais em geral (BOCKEMÜHL; WONG, 2003).

Os padrões de resistência à fármacos de *Y. enterocolitica* são sorogrupos específicos e são governados em parte pela produção de duas lactamases codificadas por genes cromossomais e designadas β -lactamases A e B. Essas lactamases são produzidas principalmente nas linhagens dos sorogrupos O:3 e O:9, sendo responsáveis pela resistência à penicilina, ampicilina, cefalotina e carbenicilina (BOCKEMÜHL; WONG, 2003).

Estudos realizados por Falcão et al., (2004, 2006), relataram linhagens de *Y. enterocolitica* resistentes ao menos à ampicilina e cefalotina, independentemente de terem sido isoladas de fezes diarréicas humanas, animais, alimentos ou do meio ambiente, o que concorda com os resultados obtidos em outros estudos onde foi observado, com frequência, resistência a ampicilina e a muitas cefalosporinas (TZELEPI et al., 1999; STOCK et al., 2000; WHITE et al., 2002).

1.3 *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A

Dos seis biotipos de *Yersinia enterocolitica*, o biotipo 1A é o mais heterogêneo, abrangendo um vasto número de sorogrupos, entre os quais o O:4, O:5, O:6,30, O:6,31, O:7,8, O:7,13, O:10, O:14, O:16, O:21, O:22, O:25, O:37, O:41,42, O:46, O:47, O:57 e os não-tipáveis (NT). Entre esses sorogrupos, os mais comuns são o O:5, O:6,30, O:6,31, O:7,8, O:10 e as linhagens O não-tipáveis. A diversidade das linhagens do biotipo 1A é também evidente quando estas são analisadas por técnicas moleculares como ribotipagem ou *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), que demonstraram que linhagens biótipo 1A de um mesmo sorogrupo apresentam alta diversidade genética, o que não é o observado para as linhagens portadoras do plasmídio pYV dos biotipos 1B e 2 a 5 (TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003).

Uma característica comum às linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, é que elas usualmente não carregam o plasmídio pYV. Por essa razão e também porque são frequentemente isoladas do meio ambiente e de animais saudáveis, linhagens desse biotipo são consideradas como não-patogênicas (TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003).

Apesar da falta de determinantes de virulência clássicos em *Y. enterocolitica* biotipo 1A, essa bactéria foi isolada de humanos com doenças gastrintestinais. Porém, em muitos desses estudos, não se pôde determinar com certeza se as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A isoladas eram de fato as causadoras das gastrenterites (TOMA; LAFLEUR, 1974; CAPRIOLI et al., 1978; ROBINS-BROWNE et al., 1979; MARKS et al., 1980; WEISSFELD; SONNENWIRTH, 1980; SHAYEGANI et al., 1981; MARYMONT et al., 1982; RATNAM et al., 1982; SNYDER et al., 1982; KAY et al., 1983; SKURNIK et al., 1983; BUTLER et al., 1984; SETO; LAU, 1984; FUKUSHIMA et al., 1985; MCINTYRE; NNOCHIRI, 1986; GREENWOOD; HOOPER, 1987; NOBLE et al., 1987; BISSETT et al., 1990; GREENWOOD; HOOPER, 1990; BUTT et al., 1991; PHAM et al., 1991; ONYEMELUKWE, 1993; CIMOLAI et al., 1994; FENWICK; MACCARTHY, 1995; STOLK-ENGELAAR; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1996; SULAKVELIDZE et al., 1996; TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003).

A associação das linhagens desse biotipo como causa de doença foi comprovada somente nos estudos realizados por Ebringer e colaboradores (1982) e Morris e colaboradores (1991).

A maioria dos relatos de infecção pelo biotipo 1A, se referem a casos de infecção esporádica, tendo sido relatados até o momento dois surtos de infecção gastrintestinal relacionados a esse biotipo. Ratnam e colaboradores (1982), no Canadá descreveram um surto nosocomial de diarreia que foi atribuído a uma linhagem do biotipo 1A sorogrupo O:5 e que afetou nove pacientes hospitalizados que adquiriram a infecção de dois pacientes que tinham sido previamente hospitalizados com diarreia intermitente. Greenwood e colaboradores (1990), isolaram *Y. enterocolitica* biotipo 1A, sorogrupo O:10, de 19 pacientes em um hospital na Inglaterra durante o período de três meses. Posteriormente, esses mesmos pesquisadores, isolaram linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, sorogrupo O:6,30 de 17 crianças hospitalizadas durante o período de um mês. Constatou-se que a fonte da linhagem bacteriana foi leite pasteurizado que tinha sido contaminado com uma pequena quantidade de leite cru.

O número de relatos publicados de infecções por *Y. enterocolitica* biotipo 1A, provavelmente não condizem com a verdadeira prevalência dessas infecções, pois muitos laboratórios de diagnóstico não dão importância ao possível potencial patogênico dessas linhagens e não relatam seu isolamento. As técnicas laboratoriais

para isolamento de *Yersinia enterocolitica* dos biotipos 1B e 2 a 5 de fezes, não são as ideais para isolar linhagens do biotipo 1A. Por exemplo, o enriquecimento de culturas a 4°C aumenta a probabilidade de isolamento do biotipo 1A de amostras fecais, porém tal enriquecimento não é realizado em laboratórios de rotina por aumentar as chances de isolamento de linhagens de *Y. enterocolitica* “não patogênicas” (TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003).

Infecções em animais são pouco relatadas, pois na maioria das vezes *Y. enterocolitica* biotipo 1A é isolada de animais saudáveis (TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003). Entretanto, Platt-Samoraj e colaboradores (2006), isolaram linhagens do biotipo 1A de fetos abortados de porco, bem como de suas placentas e em *swabs* retais e vaginais das porcas que estavam abortando. McNally e colaboradores (2004) comparando bioquimicamente linhagens isoladas de animais domésticos com linhagens isoladas de yersiniose humana na Inglaterra, encontraram o biotipo 1A em sua maioria nos dois casos, sugerindo uma possível contaminação de humanos por esses animais. Além desses, outros casos de isolamento do biotipo 1A de animais usados na alimentação de humanos foram relatados (FLOCCARI et al., 2000; ARNOLD et al., 2006).

Infecções pelo biotipo 1A, ao contrário das infecções por linhagens portadoras do plasmídio pYV, são geralmente limitadas ao trato gastrointestinal, tendo como principais sintomas a diarreia, dores abdominais, febre, náuseas, vômito e indisposição. Entretanto, alguns casos associados com artrite reativa, e outras complicações auto-imunes também foram descritos além de colite, ileíte terminal e pseudo-apendicite (RATNAM et al., 1982; SIMMONDS et al., 1987; MORRIS JR. et al., 1991; CIMOLAI et al., 1994; STOLK-ENGELAAR e HOOGKAMP-KORSTANJE, 1996; BURNENS et al., 1996; TENNANT; GRANT; ROBINS-BROWNE, 2003).

A infecção pelo biotipo 1A pode persistir por várias semanas ou meses, incluindo períodos de doença aguda e remissão. Sua duração e severidade são iguais às infecções causadas por linhagens dos biotipos patogênicos clássicos. Entretanto, infecções por linhagens desse biotipo são comuns a todos os grupos de idade, o que contrasta com infecções causadas pelos biotipos portadores do plasmídio pYV (biotipos 1B e 2 a 5) que causam sobretudo infecções em crianças menores de cinco anos (CAPRIOLI et al., 1978; RATNAM et al., 1982; SNYDER et al., 1982; GREENWOOD e HOOPER, 1987; NOBLE et al., 1987; SIMMONDS et al.,

1987; MORRIS JR., et al., 1991; CIMOLAI et al., 1994; STOLK-ENGELAAR; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1996; LOBATO et al., 1998).

Um dado interessante, é que alguns pacientes infectados com esse biotipo produziram um anticorpo específico como resposta à infecção, dando evidências para a importância clínica do biotipo 1A (MARYMONT et al.; 1982; SKURNIK et al.; 1983).

O conhecimento a respeito da patogênese de linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A ainda é pouco, porém alguns estudos a respeito dos mecanismos de virulência dessas linhagens foram realizados demonstrando a alta prevalência de alguns genes em linhagens do biotipo 1A em comparação a linhagens de outros biotipos. Um exemplo desses genes é o *ystB*, codificante para a enterotoxina YstB, presente no biotipo 1A tanto em linhagens de origem clínica isoladas de humanos e animais e linhagens de origem não-clínica isoladas do ambiente (SINGH; VIRDI, 2004).

Outros genes muito prevalentes em linhagens do biotipo 1A foram os genes *myfA*, *hreP*, *fepA*, *fepD* e *fes*. Em contraste, os genes *ail*, *virF*, *ystA* e *ystC* raramente foram encontrados em linhagens de *Y. enterocolitica* desse biotipo (Bhagat e Viridi, 2007).

Uma habilidade fundamental atribuída a algumas bactérias patogênicas invasivas é a habilidade de evitarem a sua destruição por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Esse fato deve-se, entre outras características, a resistência a radicais superóxidos gerados por macrófagos. Foi relatado que linhagens do biotipo 1A são parcialmente resistentes aos efeitos bactericidas de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e invadem fagócitos de maneira similar às linhagens dos biotipos patogênicos (De Groote et al., 1995; GRANT et al., 1999).

Singh e Viridi (2005), demonstraram que linhagens do biotipo 1A de *Y. enterocolitica* isoladas de casos clínicos de humanos invadiram células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e HEp-2 (Células epiteliais de carcinoma de laringe humana). Em contraste, linhagens isoladas de suínos e as isoladas de água foram menos invasivas em comparação às de origem humana. Um outro estudo demonstrou que linhagens do biotipo 1A de *Y. enterocolitica* isoladas de pacientes sintomáticos foram mais aptas a invadir células CHO e HEp-2 e colonizar o trato intestinal de ratos do que linhagens isoladas do ambiente ou de alimentos (GRANT et al., 1999).

1.4 Métodos de tipagem bacteriana

Os estudos clássicos de tipagem bacteriana eram praticamente baseados em resultados de metodologias fenotípicas, tais como biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, padrão de resistência a antimicrobianos, entre outras. Entretanto, tais metodologias fenotípicas possuem um baixo poder em discriminar linhagens de uma mesma espécie, além de apresentarem problemas de reprodutibilidade intra e inter-laboratórios. Esses problemas têm sido minimizados pela utilização de métodos genotípicos ou moleculares (OLIVE; BEAN, 1999; WOJCIECH et al., 2004).

Os métodos moleculares geralmente usados para tipagem de linhagens de *Y. enterocolitica*, incluem entre várias metodologias a análise de plasmídios com enzimas de restrição (REAP) e a análise cromossomal com enzimas de restrição (REAC) como é feito nas metodologias de *Pulsed-field gel eletrophoresis* (PFGE) e ribotipagem, entre outras (NESBAKKEN et al., 1987; KAPPERUND et al., 1990; BLUMBERG et al., 1991; BUCHRIESER et al., 1994; NAJDENSKI et al., 1994; SAKEN et al., 1994; ITEMAN et al., 1996; MENDONZA et al., 1996; ASPLUND et al., 1998; LOBATO et al., 1998; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999, 2001a,b, 2004; FALCÃO et al., 2006). A técnica de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), apesar de ter sido pouco utilizada até o momento, tem demonstrado ser uma boa ferramenta em estudos epidemiológicos e de tipagem de *Y. enterocolitica* (WOJCIECH et al., 2004; SACHDEVA; VIRDI, 2004, FALCÃO et al., 2006, BHAGAT; VIRDI, 2007; BELT; HOHN; GBAKIMA; HIGGINS, 2007).

Especificamente, em relação à tipagem molecular de *Y. enterocolitica* biotipo 1A, há poucos estudos. Dois trabalhos preliminares de tipagem molecular, por ribotipagem e PFGE, compreendendo poucas linhagens de *Y. enterocolitica* 1A, exclusivamente do sorogrupo O:5, demonstraram que há uma considerável diversidade genética entre essas linhagens apesar delas serem do mesmo bio-sorogrupo (NADJENSKI et al., 1994; ITEMAN et al., 1996). Em estudos mais recentes, essa diversidade genética também foi observada por Fearnley e colaboradores (2005) utilizando *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). O mesmo foi observado por Falcão et al. (2006) utilizando ERIC-PCR e PFGE na tipagem de linhagens biotipo 1A de diversos sorogrupos, isoladas de vários alimentos provenientes de diferentes cidades, Estados e regiões do Brasil. Ao contrário, Sachdeva e Viridi (2004) e Gulati e Viridi (2007) utilizando *Repetitive Extragenic Palindrome* (REP-PCR), ERIC-PCR, ribotipagem e análise de restrição

do gene *gyrB*, observaram uma diversidade genotípica limitada entre linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A de diversos sorogrupos, isoladas de humanos, animais e ambiente provenientes da Índia, França, Alemanha e dos Estados Unidos.

1.5 ERIC-PCR

Famílias de seqüências intergênicas repetitivas (30-150pb) têm sido descritas em enterobactérias, sendo muitas famílias restritas a determinada espécie ou a espécies muito relacionadas, enquanto outras espécies não possuem tais elementos (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP; 2006).

Muitas seqüências repetitivas são palíndromos imperfeitos com potencial de formar estruturas secundárias, que podem melhorar a estabilidade do mRNA. Por outro lado, muitos elementos repetitivos podem ser material genético não funcional (WILSON; SHARP, 2006).

A família de elementos repetitivos chamada *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) também conhecida como *Intergenic Repeat Units* (IRUs), é um palíndromo imperfeito de 127 pb que ocorre em múltiplas cópias no genoma de bactérias entéricas e víbrios (VERSALOVIC et al., 1991; WILSON; SHARP, 2006). Esses elementos ERIC contêm uma região central altamente conservada e localizada em regiões intergênicas não codificantes do genoma bacteriano, ou seja, situam-se entre genes transcritos dentro ou fora de *operons*, com sua posição variando em relação à posição das seqüências de terminação e promotora de genes, fazendo com que apenas uma pequena parte destas seqüências ERIC seja transcrita na forma de mRNA (SHARPLES; LLOYD, 1990; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

O número de cópias de seqüências ERIC varia entre as espécies (WILSON; SHARP, 2006). Em espécies patogênicas de *Yersinia*, as seqüências ERIC correspondem a aproximadamente 0,7% e 0,45% do conteúdo total de DNA de *Y. enterocolitica* e *Y. pestis*, respectivamente (DE GREGÓRIO et al., 2005).

Seqüências ERIC têm sido usadas como base para uma técnica de tipagem bacteriana denominada ERIC-PCR. Essa metodologia utiliza uma *polimerase chain reaction* (PCR) com *primers* consenso para amplificar regiões entre seqüências ERIC do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Essas análises por PCR revelam distâncias inter-ERIC e padrões de bandas específicos para as espécies bacterianas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Dependendo da distância entre duas dessas seqüências adjacentes, a porção de DNA compreendida entre elas será amplificada pela PCR. Se a posição das cópias varia entre diferentes linhagens, os produtos de amplificação sustentam um perfil característico e serão visualizados como bandas de diferentes tamanhos em um gel de agarose (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992; WILSON; SHARP, 2006).

Como diferentes linhagens bacterianas apresentam polimorfismo quanto ao número e posição dessas seqüências, esse padrão de bandas resultante da PCR é utilizado para diferenciá-las. A comparação entre os perfis eletroforéticos de diferentes linhagens pode, portanto, ser utilizado para determinar o grau de similaridade entre as linhagens testadas. Considerando que o perfil de bandas gerado através desta reação é reprodutível e que uma mesma linhagem bacteriana testada repetidas vezes, apresenta sempre o mesmo padrão, pode-se dizer que esse método de tipagem é eficiente e que o padrão de bandas obtido é específico para cada linhagem (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992).

1.6 Pulsed Field gel electrophoresis (PFGE)

O cromossomo é um componente fundamental de identidade da célula bacteriana e, portanto, representa um meio para verificar o inter-relacionamento de linhagens. Um modo de verificar esse inter-relacionamento é digerir o DNA cromossomal com enzimas de restrição, resultando em uma série de fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes perfis quando analisados por eletroforese em gel de agarose (SINGH et al., 2006).

Enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios menos freqüentes, geram fragmentos desse DNA muito grandes para serem analisados por uma eletroforese convencional. Um método alternativo para a análise dessas bandas é a técnica de *Pulsed-field gel eletrophoresis* (PFGE) (SINGH et al., 2006).

Essa técnica permite a separação de fragmentos de DNA maiores que 10Kb, pois ao invés de aplicar a corrente elétrica em uma única direção do gel, como é feito na eletroforese convencional, a corrente é aplicada em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos de tempo (pulsos), através de grupos de eletrodos (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

A análise desse padrão de bandas é realizada por *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo a similaridade genômica entre elas (SINGH et al., 2006).

PFGE é considerada uma das mais reprodutíveis e mais discriminatórias técnicas de tipagem molecular, e tem sido aplicada com sucesso em um grande número de espécies bacterianas, entre essas *Yersinia enterocolitica* (SAKEN et al., 1994; NAJDENSKI; ITEMAN; CARNIEL, 1994; LAMBERTZ; DANIELSSON-THAM, 2005; FALCÃO et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA; STOLLE; STEPHAN, 2007).

1.7 *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A no Brasil

O isolamento e o estudo de *Yersinia enterocolitica* não são muito freqüentes no Brasil, o que dificulta avaliar a dimensão do envolvimento dessa bactéria como causadora de doença nos seres humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença em alimentos e no meio-ambiente (FALCÃO et al., 2006).

Particularmente, linhagens brasileiras de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A, isoladas de material clínico de humanos e animais não foram estudadas, sendo, portanto desconhecido o potencial patogênico dessas linhagens e a capacidade das mesmas causarem doença. Também não se sabe o grau de similaridade genômica entre linhagens biotipo 1A de origem clínica e não-clínica (FALCÃO et al., 2008). A obtenção de tais informações ajudarão na compreensão da epidemiologia, bem como, poderão constatar o possível envolvimento de linhagens biotipo 1A, antes consideradas não-patogênicas, como causa de infecções no país.

CONCLUSÕES

2. CONCLUSÕES

- Entre as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A de origem clínica e não-clínica não foi observado diferença do potencial patogênico frente aos testes fenotípicos de fermentação da salicina, hidrólise da esculina, atividade da pirazinamidase, resistência a reativos intermediários de oxigênio e invasão a células HEp-2.
- As linhagens de origem não-clínica foram mais invasivas a células Caco-2 do que as de origem clínica ($p < 0,05$) o que sugere que o potencial patogênico possivelmente não está estritamente relacionado à fonte de isolamento ser de origem clínica.
- Linhagens do biotipo 1A de *Y. enterocolitica* de origem clínica e não-clínica, não diferiram estatisticamente quanto a prevalência dos genes de virulência *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC* e *hreP* ($p > 0,05$).
- Foi observada uma alta similaridade genômica entre a maioria das linhagens isoladas de humanos e animais nas análises de ERIC-PCR e PFGE, o que evidencia os animais como sendo importantes reservatórios de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A;
- A alta similaridade genômica entre a maioria das linhagens do biotipo 1A de origem clínica e não-clínica, pelos dados de ERIC-PCR e PFGE, sugere que isolados de alimentos e ambiente tem sido fonte de contaminação de humanos e animais;
- As técnicas de ERIC-PCR e PFGE discriminaram similarmente linhagens do biotipo 1A de diversas origens, o que é evidenciado pelo índice de discriminação (D);
- A metodologia de ERIC-PCR agrupou a maioria das linhagens em subgrupos conforme a fonte de isolamento, visto que a maioria das linhagens de origem clínica se agrupou em um mesmo subgrupo, bem como a maioria das linhagens não-clínicas em dois subgrupos respectivamente.
- A técnica de ERIC-PCR conseguiu separar em grupos distintos linhagens com um possível maior potencial patogênico, o que é evidenciado pela presença dos genes *myfA*, *ystB* e *hreP* exclusivamente nas linhagens do grupo B do dendrograma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSIC, s.; BOCKEMÜHL, J.; LANGE, F. Studies on the serology and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. **Zentralblatt für Bakteriologie**, n.261, p. 299-310, 1986.

ARNOLD, T.; NEUBAUER, H.; GANTER, M.; NIKOLAOU, K.; ROESLER, U.; TRUYEN, U.; HENSEL, A. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in goat herds from Northern Germany. **Journal of Veterinary Medicine**, n.53, p.382-386, 2006.

ASPLUND, K.; JOHANSSON, T.; SIITONEN, A. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments in the discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3. **Epidemiology and Infection**, n.121, p.579-586, 1998.

BAUAB, T.M.; FALCÃO, D.P. Experimental infection of mice with *Yersinia* strains bearing or not bearing the virulence-associated plasmid. **Contributions to Microbiology and Immunology**, n.12, p.144-55, 1991.

BELT, K.T.; HOHN, C.; GBAKIMA, A.; HIGGINS, J.A. Identification of culturable stream water bacteria from urban, agricultural, and forested watersheds using 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Water and Health**, n.5, p.395-406, 2007.

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 Microbiology Letters**, n.266, p.177-183, 2007.

BISSET, M.L.; POWERS, C.; ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency and serogroup distribution. **Journal of Clinical Microbiology**, n.28, p. 910-912, 1990.

BLAZEVIC, D.J.; EDERER, G.M. Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. In: HÉDEN, C.G. **Techniques in pure and applied microbiology**, John Wiley & Sons: Nova Iorque, cap.5, p.15-18, 1975.

BLUMBERG, H.M.; KIEHLBAUCH, J.A.; WACHSMUTH, I.K. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphism of rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, n.29, p.2368-2374, 1991.

BOCKEMÜHL, J.; WONG, J.D. *Yersinia*. In: MURRAY, P.C. BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H.; **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed. American Society for Microbiology: Washington, p. 672-683, 2003.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v.1, p.323-333, 1999.

BUCHRIESER, C.; BUCHRIESER, O.; KRISTL, A.; KASPAR, C.W. Clamped homogeneous electric fields (CHEF) gel-electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia spp.* **Zentralblatt fur Bakteriologie**, n.281, p.457-470, 1994.

BURNENS, A.P.; FREY, A.; NICOLET, J. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. **Epidemiology and Infection**, n.116, p.27-34, 1996.

BUTLER, T.; ISLAM, M.; ISLAM, M.R.; AZAD, A.K.; HUQ, M.I.; SPEELMAN, P.; ROY, S.K. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* from fatal cases of diarrhoeal illness in Bangladesh. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n.78, p.449-450, 1984.

BUTT, H.L.; GORDON, D.L.; LEE-ARCHER, T.; MORITZ, A.; MERRELL, W.H. Relationship between clinical and milk isolates of *Yersinia enterocolitica*. **Pathology**, n.23, p.153-157, 1991.

CAPRIOLI, T.; DRAPEAU, A.J.; KASATIYA, S. *Yersinia enterocolitica*: serotypes and biotypes isolated from humans and the environment in Quebec. **Journal of Clinical Microbiology**, n.8, p.7-11, 1978.

CARNIEL, E. Chromosomal virulence factors of *Yersinia*: na update. **Contributions to Microbiology and Immunology**, n.13, p.218-224, 1995.

CIMOLAI, N.; TROMBLEY, C.; BLAIR, G.K. Implications of *Yersinia enterocolitica* biotyping. **Archives of Disease in Childhood**, n.70, p.19-21, 1994.

CORNELIS, G.R. BOLAND, A.; BOYD, A.P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M.P.; STAINIER, I. The virulence plasmid of *Yersinia* an antihost genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.4, p.1315-1352, 1998.

CORNELIS, G.R. The *Yersinia* YSC-Yop "type III" weaponry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n.3, p.742-752, 2001.

COVONE, M.G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; DIAS DA SILVEIRA, W.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, C.L. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains expressing *Escherichia coli* mutant heat labile enterotoxin. **Infection and Immunity**, n.1, p.224-231, 1998.

DE GREGORIO, E.; SILVESTRO, G.; PETRILLO, M.; CARLOMAGNO, M.S.; DI NOCERA, P.P. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in *Yersiniae*: genomic organization and functional properties. **Journal of Bacteriology**, n.23, p.7945-7954, 2005.

DE GROOTE, M.A.; GRANGER, D.; XU, Y.; CAMPBELL, G.; PRINCE, R. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, n.14, p. 6399-6403, 1995.

EBRINGER, R.; COLTHORPE, D.; BURDEN, G.; HINDLEY, C.; EBRINGER, A. *Yersinia enterocolitica* biotype 1. Diarrhoea and episodes of HLA B27 related ocular and rheumatic inflammatory disease in South-East England. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, n.11, p.171-176, 1982.

EWING, W.H.; ROSS, A.J.; BRENER, D.J.; FANNING, G.R. *Yersinia ruckeri* sp. Nov., the redmouth (RM) bacterium. **International journal of systematic bacteriology**, n.1, p.37-44, 1978.

FALCÃO, J.P.; BROCCHI, M.; PROENÇA-MÓDENA, J.L.; ACRANI, G.O.; CORRÊA, E.F.; FALCÃO, D.P. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersiniae* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **Journal of Applied Microbiology**, n.96, p.1230-1236, 2004.

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.09-19, 2006.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P.; PITONDO-SILVA, A.; MALASPINA, A.C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 1539-1548, 2006.

FALCÃO, J.P.; CORRÊA, E.F.; MARTINS, C.H.G.; FALCÃO, D.P. Panoramic view of the occurrence of *Yersinia* species other than *Y. pestis* in Brazil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.1, p.01-16, 2008.

FARMER III, J.J.; FANNING, G.R.; DAVIS, B.R.; O'HARA, C.M.; RIDLE, C.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; ASBURY, M.A.; BRENNER, D.J. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology** n.21, p. 46-76, 1985.

FARMER III, J.J.; CARTER, G.P.; MILLER, V.L.; FALKOW, S.; WACHSMUTH, I.K. Pirazinamidase, CR-MOX agara, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and d-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.10, 1992.

FEARNLEY, C.; ON, S.L. KOKOTOVIC, B.; MANNING, G.; CHEASTY, T.; NEWELL, D.G. Application of fluorescent amplified fragment length polymorphism for comparison of human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica*. **Applied and Environmental Microbiology**, n.9, p. 4960-4965, 2005.

FENWICK, S.G.; MCCARTHY, M.D. *Yersinia enterocolitica* is a common cause of gastroenteritis in Auckland. **New Zealand Medical Journal**, n. 108, p.269-271, 1995.

FLOCCARI, M.E.; CARRANZA, M.M.; PARADA, J.L. *Yersinia enterocolitica* biogroup 1A, serotype O:5 in chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, n.11, p.1591-1593, 2000.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; AUTIO, T.; KORKEALA, H. Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel eletrophoresis. **Letters of Applied Microbiology**, n.29, p.308-312, 1999.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M; HALLANVUO, S.; KORTE, T.; SIITONEN, A.; KORKEALA, H. Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources. **Epidemiologic and Infections**, n.127, p.37-47, 2001a.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M; KORTE, T.; KORKEALA, H. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. **Letters of Applied Microbiology**, n.32, p.375-378, 2001b.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M; KOCH, U.; KLEMM, C.; BUCHER, M.; STOLLE, A. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. **International journal of food microbiology**, n.1, p. 89-94, 2004.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International journal of food microbiology**, n.3, p. 207-212, 2007.

FUKUSHIMA, H.; TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K.; KAWAOKA, Y.; NISHIO, R.; MORIKI, S.; NISHINO, Y.; MOTOTSUNE, H.; KARINO, K. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Shimane Prefecture, Japan. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, n.180, p.515-527, 1985.

GRANT, T.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. **Infection and Immunity**, v.66, p.1113-1120, 1998.

GRANT, T.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R.M. Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. **Infections and Immunology**, n.67, p.4367-4375, 1999.

GREENWOOD, M.H.; HOOPER, W.L. Human carriage of *Yersinia enterocolitica* spp. **Journal of Medical Microbiology**, n.23, p.345-348, 1987.

GREENWOOD, M.H.; HOOPER, W.L. Excretion of *Yersinia* spp. Associated with consumption of pasteurized milk. **Epidemiology and Infection**, n.104, p.345-350, 1990.

GUIYOULE, A.; RASOAMANNA, B.; BUCHRIESER, C.; MICHAEL, P.; CHANTEAU, S.; CARNIEL, E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. **Journal of clinical microbiology**, n.35, 2826-2833, 1997.

GULATI, P.S.; VIRDI, J.S. The *rrn* locus and *gyrB* genotyping confirm the existence of two clonal groups in strains of *Yersinia enterocolitica* subspecies palearctica biovar 1A. **Research in Microbiology**, n.158, p.236-243, 2007.

HARTLAND, E.L.; ROBINS-BROWNE, R.M. Infections with enteropathogenic *Yersinia* species: paradigms of bacterial pathogenesis. **Reviews in Medical Microbiology**, n.9, p. 191-205, 1998.

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. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.12, 2001.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th ed. Baltimore: Willians and Wilkins; p.189, 1994.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.

IBRAHIM, A.; LIESACK, W.; GRIFFITHS, M.W.; ROBINS-BROWNE, R.M. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of

Yersinia heat-stable enterotoxin gene (*yst*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1636-1638, 1997.

IRIARTE, M.; VANOOTEGHEM, J.C.; DELOR, I.; DIAZ, R.; KNUTTON, S.; CORNELIS, G.R. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. **Molecular Biology**, n.9, p.507-520, 1993.

ITEMAN, I.; GUIYOULE, A.; CARNIEL, E.; Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. **Journal of Medical Microbiology**, n.45, p.48-56, 1996.

KANDOLO, K.; WAUTERS, G. Pyrazinamidase Activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, n.6, p.980-982, 1985.

KAPPERUND, G.T.; NESBAKKEN, T.; ALEKSIC, S.; MOLLARET, H.H. Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, n.28, p.1125-1131, 1990.

KAY, B.A.; WACHSMUTH, K.; GEMSKI, P.; FEELEY, J.C.; QUAN, T.J.; BRENNER, D.J. Virulence and phenotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from human in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, n.17, p.128-138, 1983.

KOT, B. & TRAFNY, E.A. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. **Polish journal of veterinary sciences**, n.7, p.27-31, 2004.

KUEHNI-BOGHENBOR, K.; ON, S.L.W.; KOKOTOVIC, B.; BAUMGARTNER, A.; WASSENAAR, T.M.; WITTEW, M.; BISSING-CHOISAT, B.; FREY, J. Genotyping of human and porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia bercovieri* strains from Switzerland by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, n.6, p.4061-4066, 2006.

LAMBERTZ, S.T.; DANIELSSON-THAM, M.L. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and Pulsed-field gel electrophoresis. **Applied and Environmental microbiology**, v.71, n.7, p.3674-3681, 2005.

LEE, T.S.; LEE, S.W.; SEOK, W.S.; YOO, M.Y.; YOON, J.W.; PARK, B.K.; MOON, K.D.; OH, D.H. Prevalence, antibiotic susceptibility and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* and related species from ready-to-eat vegetables available in Korea. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1123-1127, 2004.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequence in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, n.14, p.4525-4529, 1992.

LOBATO; M.J.; LANDERAS, E.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and

relationship between ribotypes, serotypes and biotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, n.1, p.3297-3302, 1998.

MARYMONT, J.H.Jr.; DURFEE, K.K.; ALEXANDRE, H.; SMITH, J.P. *Yersinia enterocolitica* in Kansas. Attempted recovery from 1.212 patients. **American Journal of Clinical Pathology**, n.77, p.753-754, 1982.

McINTYRE, M.; NNOCHIRI, E. A case of hospital-acquired *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis. **Journal of Hospital Infections**, n.7, p.299-301, 1986.

McNALLY, A.; CHEASTY, T.; FEARNLEY, C.; DALZIEL, R.W.; PAIBA, G.A.; MANNING, G.; NEWELL, D.G. Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. **Letters in Applied Microbiology**, n.39, p.103-108, 2004.

McNALLY, A.; DALTON, T.; LA-RAGIONE, R.M.; STAPLETON, K.; MANNING, G.; NEWELL, D.G. *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 **Journal of medical microbiology**, n.55, p. 1725-1734, 2006.

MARKS, M.I.; PAI, C.H.; LAFLEUR, L.; LACKMAN, L.; HAMMERBERG, O. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features. **The Journal of Pediatrics**, n.96, p.26-31, 1980.

MENDOZA, M.C.; ALZUGARAY, R.; LANDERAS, E.; GONZALES-HEVIA, M.A. Discriminatory power and application of ribotyping of *Yersinia enterocolitica* O:3 in epidemiological study. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, n.15, p.220-226, 1996.

MILLER, V.L.; FALKOW, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity** n.56, p.1242-1248, 1988.

MORRIS Jr., J.G. PRADO, V.; FERRECCIO, C.; ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; CAYAZZO, M.; KAY, B.A.; LEVINE, M.M. *Yersinia enterocolitica* isolated from two cohorts of young children in Santiago, Chile: incidence of and lack of correlation between illness and proposed virulence factors. **Journal of Clinical Microbiology**, n.28, p.2784-2788, 1991.

NAJDENSKI, H.; ITEMAN, I.; CARNIEL, E. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, n.32, p.2913-2921, 1994.

NAKAJIMA, H.; INOUE, M.; MORI, T.; ITOH, K-I.; ARAKAWA, A.E.; WATANABE, H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, p. 2484-2486, 1992.

NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; SORUM, H.; DOMMARSNES, K.; Structural variability of 40-50 MDa virulence plasmids from *Yersinia enterocolitica*. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, n.95, p.167-173, 1987.

NOBLE, M.A.; BARTELUK, R.L.; FREEMAN, H.J.; SUBRAMANIAM, R.; HUDSON, J.B. Clinical significance of virulence-related assay of *Yersinia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 25, p.802-807, 1987.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, n.6, p.1661-1669, 1999.

ONYEMELUKWE, N.F. *Yersinia enterocolitica* as na aetiological agent of childhood diarrhoea in Enugu, Nigéria. **Central África Journal Medicine**, n.39, p.192-195, 1993.

PHAM, J.N.; BELL, S.M.; LANZARONE, J.Y.M. Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, p.28, n.13-18, 1991.

PHAM, J.N.; BELL, S.M. β -Lactamase induction by imipenem in *Yersinia enterocolitica*. **Pathology**, n.24, p.201-204, 1992.

PHAM, J.N.; BELL, S.M. The prevalence of inducible β -Lactamase in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **Pathology**, n.25, p.385-387, 1993.

PLATT-SAMORAJ, A.; UGORSKI, M.; SZWEDA, W.; SZCZERBA-TUREK, A.; WOJCIECH, K.; PROCAHO, Z. Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. **Journal of Veterinary Medicine**, n.53, p.341-346, 2006.

PIERSON, D.E. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance *ail*-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mamalian cells. **Journal of Bacteriology**, n.176, p.4043-4051, 1994.

RAMAMURTHY, T.; YOSHINO, K-I.; HUANG, X.; NAIR, G.B.; CARNIEL, E.; MARUYAMA, T.; FUKUSHIMA, H.; TAKEDA, T. The novel heat-stable enterotoxin

subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. **Microbiol. Pathogen**, v. 23, p. 189-200, 1997.

RASMUSSEN, H.N.; RASMUSSEN, O.F.; ANDERSEN, J.K.; OLSEN, J.E. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 99-108, 1994.

RATNAM, S.; MERCER, E.; PICCO, B.; PARSONS, S.; BUTLER, R. A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. **Journal of Infectious Disease**, n.145, p.242-247, 1982.

ROBINS-BROWNE, R.M.; JACOBS, M.R.; KOORNHOF, H.J.; MAUFF, A.C. *Yersinia enterocolitica* biotype 1 in South Africa. **South Africa Medical Journal**, n.55, p.1057-1060, 1979.

ROBINS-BROWNE, R.M. *Yersinia enterocolitica*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTIVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, American Society for Microbiology: Washington, DC: cap.11, p.192-211, 2001.

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 Microbiology Letters**, n.240, p.193-201, 2004.

SCHIEMANN, D.A. Examination of enterotoxin production at low temperatures by *Yersinia enterocolitica* in culture media and foods. **Journal of Food Protection**, n.51, p.571-573, 1988.

SAKEN, E.; ROGGENKAMP, A.; ALEKSIC, S.; HEESEMAN, J. Characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroups by pulsed-field gel electrophoresis of genomic *NotI* restriction fragments. **Journal of Medical Microbiology**, n.41, p.329-338, 1994.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Yersinia pestis*, the cause of plague and its relatives. In: SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Bacterial pathogenesis. Washington, DC: **ASM Press**, p.202-215, 2002

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: a laboratory Manual. 3rd ed., New York. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SCHUBERT, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p.6387-6395, 1999.

SETO, W.H.; LAU, J.T. Septicaemia due to *Yersinia enterocolitica* biotype 1 in Hong Kong. **Journal of Infection**, n.8, p.28-33, 1984.

SHARPLES, G.J.; LLOYD, R.G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, n.18, p.6503-6508, 1990.

SHAYEGANI, M.; DeFORGE, I.; McGLYNN, D.M.; ROOT, T. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal and environmental sources. **Journal of Clinical Microbiology**, n.14, p.304-312, 1981.

SILBERT, S.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, n.47, p.619-621, 2003.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, v.163, p.688-1949.

SIMMONDS, S.D.; NOBLE, M.A.; FREEMAN, H.J. Gastrointestinal features of culture-positive *Yersinia enterocolitica* infection. **Gastroenterology**, n.92, p.112-117, 1987.

SINGH, I.; VIRDI, J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Medical Microbiology**, n.53, p.1065-1068, 2004.

SINGH, I.; VIRDI, J.S. Interaction of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains of diverse origin with cultured cells in vitro. **Journal of Infectious disease**, n.58, p.31-33, 2005.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M.J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical microbiology reviews**, v.19, n. 3, p.512-530, 2006.

SKURNIK, M.; NURMI, T.; GRANFORS, K.; KOSKELA, M.; TIILIKAINEN, A.S. Plasmid associated antibody production against *Yersinia enterocolitica* in man. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, n.15, p. 173-177, 1983.

SNYDER, J.D.; CHRISTENSON, E.; FELDMAN, R.A. Human *Yersinia enterocolitica* infections in Wisconsin. Clinical, laboratory and epidemiologic features. **American Journal of Medicine**, n.72, p. 768-774, 1982.

SPRAGUE, L.D.; NEUBAUER, H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.831-835, 2005.

STOCK, I.; HUSIG, P.; WIEDEMANN, B.; Beta lactamase expression in *Y. enterocolitica* biovars 1A, 1B and 3. **Journal of Medical Microbiology**, n.49, p.403-408, 2000.

STOLK-ENGELAAR, V.M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, n.28, p.571-575, 1996.

SULAKVELIDZE, A.; DALAKISHVILI, K.; BARRY, E.; WAUTERS, G.; ROBINS-BROWNE, R.; IMNADZE, P.; MORRIS Jr., J.G. Analysis of clinical and environmental *Yersinia* isolates in the Republic of Georgia. **Journal of Clinical Microbiology**, n.34, p.2325-2327, 1996.

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

TENNANT, S.M.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n.38, p.127-137, 2003

TENNANT, S.M.; SKINNER, N.A.; JOE, A.; ROBINS-BROWNE, R. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6860-6867, 2005.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v.33, n.9, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection control and epidemiology*, n.18, p.426-439, 1997.

THOERNER, P.; BIN KINGOMBE, C.I.; BÖGLI-STUBER, K.; BISSING-CHOISAT, B.; WASSENAAR, T.M.; FREY, J.; JEMMI, T. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigations of virulence gene distribution. **Applied and Environmental microbiology**, v.69, n.3, p.1810-1816, 2003.

TIBANA, A.; WARKEN, M.B.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.; NOLETO, A.L.S. Occurrence of *Yersinia species* in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, n.50, p.580-583, 1987.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM – modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v.13, p.309-315, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILi – um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**, v.13, p.230-235, 1982b

TOMA, S.; LAFLEUR, L. Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Canadá. **Applied Microbiology**, n.28, p.469-473, 1974.

TZELEPI, E.; ARVANITIDOU, M.; MAVROIDI, A.; TSAKRIS, A.; Antibiotic susceptibilites of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* isolates from aquatic environments. **Journal of Medical Microbiology**, n.48, p.157-160, 1999.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, n.24, p.6823-6831, 1991.

ZHENG, H.; SUN, Y.; MAO, Z.; JIANG, B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, p.1-7, 2008.

WANG, X.; QIU, H.; JIN, D.; CUI, Z.; KAN, B.; XIAO, Y.; XU, Y.; XIA, S.; WANG, H.; YANG, J.; WANG, X.; HU, W.; XU, J.; JING, H. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. **International journal of food microbiology**, p. 1-8, 2008.

WANGER, A. *Yersinia*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, v.1, cap. 44, p. 688-697, 2007.

WARNKEN, M.B.; NUNES, M.P.; NOLETO, A.L.S. Incidence of *Yersinia species* in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, n.50, p.578-579, 1987.

WAUTERS, G. Antigens of *Yersinia enterocolitica*. In: BOTTONE, E.J.: *Yersinia enterocolitica*, **CRC PRESS**: p.41-53, 1981.

WEISSFELD, A.S.; SONNENWIRTH, A.C. *Yersinia enterocolitica* in adults with gastrointestinal disturbances: need for cold enrichment. **Journal of Clinical Microbiology**, n.11, p.196-197, 1980.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WANGER, D.D.; McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, n.4, p.405-412, 2002.

WILSON, L.; SHARP, P.M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, n.6, p.1156-1168, 2006.

WOJCIECH, L.; STARONIEWICZ, Z.; JAKUBCZAK, A.; UGORSKI, M.; Typing of *Yersinia enterocolitica* isolates by ITS profiling, REP and ERIC-PCR. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, n.5, p.238-244, 2004.

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

WREN, B.W. The *yersiniae*-a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. **Nature Reviews – Microbiology**, n.1, p. 55-64.