UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Genotipagem de linhagens de *Yersinia* spp. por
high-resolution melting analysis

Roberto Antonio de Souza

Ribeirão Preto

2013

Roberto Antonio de Souza

Genotipagem de linhagens de *Yersinia* spp. por
high-resolution melting analysis

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

Ribeirão Preto

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Roberto Antonio de
Genotipagem de linhagens de *Yersinia* spp. por *high-resolution melting analysis*. Ribeirão Preto, 2013.
172 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. Gênero *Yersinia*. 2. *High-resolution melting analysis* (HRMA). 3. *Single-nucleotide polymorphisms* (SNPs). 4. Genotipagem. 5. Epidemiologia molecular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto Antonio de Souza

Genotipagem de linhagens de *Yersinia* spp. por *high-resolution melting analysis*

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: _____

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*/Laboratório de Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Micro-organismos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), onde foram realizados os experimentos fenotípicos e os experimentos de *high-resolution melting analysis*, sob a orientação da *Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão*.

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foram realizados os experimentos de sequenciamento e parte dos experimentos de *high-resolution melting analysis* sob a coordenação do *Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior*.

Dedico este trabalho

À minha mãe Adinéia e à minha irmã Patrícia.
Muito obrigado pelo carinho e apoio
incondicionais. Amo vocês...

AGRADECIMENTOS

“Não existe esta coisa de homem feito por si mesmo. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma palavra de encorajamento, entrou na formação do nosso caráter e dos nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso.”

(George Matthew Adams)

À presença divina que iluminou meu caminho, protegeu-me e deu-me forças para superar os obstáculos ao longo dessa jornada.

À *Profª Drª Juliana Pfrimer Falcão*, pelas orientações durante toda a pós-graduação, valiosos ensinamentos e pela confiança em mim depositada. Agradeço o apoio, o empenho, a paciência e o exemplo de postural profissional e conduta moral durante todo esse período. Meu profundo respeito e admiração. Muito obrigado por tudo!

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*/Laboratório de Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Micro-organismos, *Fábio*, *Fernanda*, *Miliane* e *Priscilla*, muito obrigado pelas críticas, discussões científicas, apoio nos experimentos, amizade, bom humor, excelente convívio e momentos de alegria contagiante que tornaram um prazer os dias de trabalho no laboratório. É um prazer e uma honra fazer parte dessa família!

Às amigas *Lizziane* e *Stella*, pelo carinho e momentos de alegria. Vocês foram muito importantes durante essa jornada!

À *Jaqueline Passaglia* e *Eliane Figueiredo* pelo auxílio técnico-laboratorial no decorrer desse trabalho e pela amizade ao longo de toda a pós-graduação.

À *Vania Cláudia de Albuquerque* e *Wânia Maria Tavares da Silva* pelo auxílio administrativo no decorrer desse trabalho e pela amizade ao longo de toda a jornada.

Ao *Prof Dr Dimas Tadeu Covas* por permitir que os experimentos de sequenciamento fossem realizados no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática – Sala de Sequenciamento do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Ao *Prof Dr Wilson Araújo da Silva Júnior* por permitir que alguns experimentos de HRMA fossem realizados no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À *Adriana Aparecida Marques*, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela gentileza com esse trabalho e pelos sequenciamentos realizados.

À *Cristiane Ayres Ferreira*, ex-funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela gentileza com esse trabalho e pelo apoio técnico em parte dos experimentos de HRMA.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP*, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas.

À *Rosana Florêncio e Henrique Teodoro*, funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção dispensada com toda competência durante a pós-graduação.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2009/08455-1) e pelo suporte financeiro desse projeto de pesquisa (Proc. 2010/19830-5), bem como por todo o suporte financeiro ao laboratório.

A todos os meus *familiares* pelo carinho, apoio, orações, ensinamentos e alegrias de uma vida. Muito Obrigado!!!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SEIO DE MINAS

Eu nasci no celeiro da arte
No berço mineiro
Sou do campo da serra
Onde impera o minério de ferro

Eu carrego comigo no sangue
Um dom verdadeiro
De cantar melodias de Minas
No Brasil inteiro

Sou das Minas de ouro
Das montanhas Gerais
Eu sou filho dos montes
Das estradas reais

Meu caminho primeiro
Vi brotar dessa fonte
Sou do seio de Minas
Nesse estado um diamante

(Paula Fernandes)

THE STORY

All of these lines across my face
Tell you the story of who I am
So many stories of where I've been
And how I got to where I am
But these stories don't mean anything
When you've got no one to tell them to
It's true... I was made for you

I climbed across the mountain tops
Swam all across the ocean blue
I crossed all the lines and I broke all the rules
But baby I broke them all for you
Because even when I was flat broke
You made me feel like a million bucks
You do... And I was made for you

You see the smile that's on my mouth
Is hiding the words that don't come out
And all of my friends who think that I'm blessed
They don't know my head is a mess
No, they don't know who I really am
And they don't know what I've been through like you do
And I was made for you

All of these lines across my face
Tell you the story of who I am
So many stories of where I've been
And how I got to where I am
But these stories don't mean anything
When you've got no one to tell them to
It's true...I was made for you
Oh yeah it's true... I was made for you

(Phil Hanseroth)

RESUMO

SOUZA, R. A. **Genotipagem de linhagens de *Yersinia* spp. por *high-resolution melting analysis***. 2013. 172f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O gênero *Yersinia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende 17 espécies. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são reconhecidamente patógenos de humanos e animais. *Y. pestis* cause a peste. *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são agentes causadores, sobretudo, de gastroenterites transmitidas por água e alimentos. As demais 14 espécies são, usualmente, consideradas não-patogênicas, com exceção de *Y. ruckeri* sorogrupo O:1 que causa infecções em peixes. Nas últimas décadas, a tipagem molecular tornou-se uma importante ferramenta nos estudos filogenéticos de numerosos micro-organismos e o desenvolvimento de sistemas de tipagem rápidos e baratos pode facilitar os estudos epidemiológicos de infecções bacterianas. No presente estudo objetivou-se desenvolver um método de genotipagem de *Yersinia* spp. baseado em *high-resolution melting analysis* (HRMA) para diferenciar os *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) presentes nas sequências dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* e aplicá-lo na tipagem de 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* e 50 linhagens de *Y. enterocolitica*, bem como separar por HRMA as espécies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Os SNPs foram determinados nas sequências dos *loci* acima citados a partir de um conjunto de 119 linhagens de *Yersinia* spp. depositadas no GenBank/EMBL/DDBJ. Foram encontrados nas sequências dos genes analisados de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri* 10, 10, 9, 6, 4, 1 e 1 SNPs, respectivamente. Nenhum SNP foi encontrado nas sequências analisadas de *Y. pestis* e um grande número de SNPs foi encontrado nas sequências analisadas de *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. massiliensis*, o que impossibilitou a genotipagem dessas espécies por HRMA. As demais espécies não foram analisadas. Foram desenhados pares de *primers* para flanquear os SNPs encontrados em cada espécie de *Yersinia* testada. Usando um conjunto de *primers* espécie-específicos, a diversidade genética de cada espécie de *Yersinia* foi determinada por HRMA e a análise filogenética foi baseada na sequência concatenada composta pelos nucleotídeos identificados em cada fragmento analisado. O agrupamento foi realizado com o *software* BioNumerics usando o método UPGMA com 1.000 replicatas de *bootstrap*. A árvore filogenética

construída para *Y. pseudotuberculosis* agrupou as linhagens em *clusters* bio-sorogrupo específicos. As linhagens do bio-sorogrupo 1/O:1 foram agrupadas em um *cluster* e as linhagens do bio-sorogrupo 2/O:3 em outro. A árvore filogenética construída para *Y. enterocolitica* agrupou as linhagens em três grupos. As linhagens altamente patogênicas, do biotipo 1B, foram agrupadas em um *cluster*, as linhagens de média patogenicidade, dos biotipos 2, 3, 4 e 5, foram agrupadas em um segundo *cluster* e as linhagens consideradas não-patogênicas, do biotipo 1A, foram agrupadas em um terceiro *cluster*. O agrupamento encontrado em *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* foi consistente com o perfil patogênico característico dessas duas espécies. Nenhuma correlação epidemiológica significativa foi encontrada no agrupamento de *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri* de acordo com os resultados de HRMA. Ademais, o método de HRMA aqui desenvolvido foi capaz de separar as espécies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. O método de HRMA desenvolvido nesse estudo pode ser usado como uma alternativa para a genotipagem e para a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica*. Esse método também pode complementar os métodos baseados em sequências e facilitar os estudos epidemiológicos dessas duas espécies de *Yersinia*.

Palavras-chave: Gênero *Yersinia*, *High-resolution melting analysis*, *Single-nucleotide polymorphisms*, Genotipagem, Epidemiologia molecular

ABSTRACT

SOUZA, R. A. **Genotyping of *Yersinia* strains by high-resolution melting analysis**. 2013. 172f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The genus *Yersinia* belongs to the family *Enterobacteriaceae* and comprises 17 species. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* are well recognized human and animal pathogens. *Y. pestis* causes plague. *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* are, usually, causative agents of food-waterborne gastroenteritis. The other 14 *Yersinia* species are considered to be non-pathogenic, with the exception of *Y. ruckeri* serogroup O:1 which causes infections in fishes. In the last few decades, molecular typing has become an important tool in phylogenetic studies of several microorganisms and the development of fast and inexpensive typing systems can facilitate epidemiological studies of bacterial infections. The present study aimed to develop a method of *Yersinia* spp. genotyping based on high-resolution melting analysis (HRMA) in order to differentiate the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) present in the 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* and *recA* sequences and apply it in the typing of 40 *Y. pseudotuberculosis* strains and 50 *Y. enterocolitica* strains, as well as, to separate by HRMA the *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* species. The SNPs were determined in the sequences of the aforementioned loci using a set of 119 *Yersinia* strains deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ database. It were found in the gene sequences analyzed of *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* and *Y. ruckeri* 10, 10, 9, 6, 4, 1 and 1 SNPs, respectively. No SNPs was found in the analyzed sequences of *Y. pestis* and a large number of SNPs were found in the analyzed sequences of *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* and *Y. massiliensis* what prevented their genotyping by HRMA. The remaining *Yersinia* species were not analyzed. It was designed primer pairs to flank the SNPs found in each *Yersinia* species tested. Using a specie-specific set of primers, the genetic diversity of each *Yersinia* species used was determined by HRMA and the phylogenetic analysis was based on the concatenated sequence composed by the nucleotides identified in each fragment analyzed. Clustering was performed with the software package BioNumerics using UPGMA method and 1,000 bootstrap replicates. The phylogenetic tree constructed for *Y. pseudotuberculosis* grouped the strains into bio-serogroups specific clusters. The strains of 1/O:1 bio-serogroup were grouped into one cluster and the strains of 2/O:3 bio-serogroup into

other cluster. The phylogenetic tree constructed for *Y. enterocolitica* grouped the strains in three clusters. The highly pathogenic strains, of biotype 1B, were grouped into one cluster, the moderate pathogenic strains, of biotypes 2, 3, 4 and 5, were grouped into a second cluster and, the non-pathogenic strains, of biotype 1A, were grouped into a third cluster. The clusterization of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* were consistent with the pathogenic profile characteristic of these two *Yersinia* species. No significant epidemiological correlation was found in the grouping of *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* and *Y. ruckeri* according to HRMA results. Moreover, the HRMA-based method developed here was able to separate the *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* species. The HRMA assay developed in this study can be used as an alternative for the genotyping and the differentiation of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. This method can also complement sequence-based methods and facilitate epidemiological studies of these two *Yersinia* species.

Keywords: Genus *Yersinia*, High-resolution melting analysis, Single-nucleotide polymorphisms, Genotyping, Molecular epidemiology

RESUMEN

SOUZA, R. A. **Genotipaje de linajes de *Yersinia* por *high-resolution melting analysis***. 2013. 172h. Tesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende 17 especies. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* son reconocidamente patógenos de humanos y animales. *Y. pestis* causa la peste. *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* son agentes causadores, especialmente, de gastroenteritis transmitidos por agua y alimentos. Las demás 14 especies son, en general, consideradas no patogénicas, a excepción de *Y. ruckeri* serogrupo O:1 que causa infecciones en peces. En las últimas décadas, el tipaje molecular se ha convertido en una importante herramienta en los estudios filogenéticos de numerosos microorganismos y el desarrollo de sistemas de tipaje rápidos y baratos puede facilitar los estudios epidemiológicos de infecciones bacterianas. En ese estudio se objetivó desarrollar un método de genotipaje de *Yersinia* spp. basado en *high-resolution melting analysis* (HRMA) con el propósito de diferenciar los *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) presentes en las secuencias de los genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* y *recA* y aplicarlo en el tipaje de 40 linajes de *Y. pseudotuberculosis* y 50 linajes de *Y. enterocolitica*, así como separar por HRMA las especies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Los SNPs fueron determinados en las secuencias de los *loci* citados más arriba partiendo de un conjunto de 119 linajes de *Yersinia* depositada en el GenBank/EMBL/DDBJ. Fueron encontrados en las secuencias de los genes analizados de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri* 10, 10, 9, 6, 4, 1 y 1 SNPs, respectivamente. Ningún SNP fue encontrado en las secuencias analizadas de *Y. pestis* y un gran número de SNPs fue encontrado en las secuencias analizadas de *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. massiliensis*, lo que imposibilitó el genotipaje de esas especies por HRMA. Las demás especies no fueron analizadas. Fueron dibujados pares de *primers* para flanquear a los SNPs encontrados en cada especie de *Yersinia* testada. Usando un conjunto de *primers* especie-específicos, la diversidad genética de cada especie de *Yersinia* fue determinada por HRMA y el análisis filogenético fue basado en la secuencia concatenada compuesta por los nucleótidos identificados en cada fragmento analizado. El agrupamiento fue realizado por medio del *software* BioNumerics usando el método UPGMA con 1.000 replicatos de *bootstrap*. Los árboles filogenéticos

construidos para *Y. pseudotuberculosis* agrupó las linajes en clústeres bio-serogrupos específicos. Los linajes del bio-serogrupo 1/O:1 fueron agrupados en un clúster y los linajes del bio-serogrupo 2/O:3 en otro. Los árboles filogenéticos construidos para *Y. enterocolitica* agrupó los linajes en tres grupos. Los linajes altamente patógenos, del biotipo 1B, fueron agrupados en un clúster, los linajes de patogenicidad media, de biotipos 2, 3, 4 y 5, fueron agrupadas en un segundo clúster y los linajes considerados no patogénicos, del biotipo 1A, fueron agrupadas en un tercero clúster. El agrupamiento encontrado en *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* fue consistente con el perfil patogénico característico de esas dos especies. Ninguna correlación epidemiológica significativa fue encontrada en el agrupamiento de *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri* de acuerdo con los resultados de HRMA. Además, el método de HRMA aquí desarrollado fue capaz de separar las especies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. El método de HRMA desarrollado en ese estudio puede ser usado como una alternativa para la genotipaje y para la diferenciación de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Ese método también puede complementar los métodos basados en secuencias y facilitar los estudios epidemiológicos de esas dos especies de *Yersinia*.

Palabras-clave: Género *Yersinia*, *High-resolution melting analysis*, *Single-nucleotide polymorphisms*, Genotipaje, Epidemiología molecular

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA	Gene que codifica a subunidade 16S ou menor do RNA ribossômico
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
A	Adenina
Ail	Do inglês, <i>adhesion invasion locus</i>
ATCC	Do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Do inglês, <i>brain heart infusion</i>
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CIN	Cefsulodina-irgasan-novobiocina
D	Dextrógiro
d.C.	Depois de Cristo
DDBJ	Do inglês, <i>DNA Data Bank of Japan</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dnaJ</i>	Gene que codifica uma proteína chaperona de 40 kD
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dsDNA	DNA dupla-fita
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	Ágar eozina-azul de metileno
EMBL	Do inglês, <i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EPM	Ágar Escola Paulista de Medicina
ERIC	Do inglês, <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
g	Gramma
G	Guanina
<i>glnA</i>	Gene que codifica a proteína glutamina sintetase
<i>groEl</i>	Gene que codifica uma proteína chaperona de 60 kD
<i>gyrB</i>	Subunidade β da DNA girase
HPI	Do inglês, <i>high pathogenic island</i>
HRMA	Do inglês, <i>high-resolution melting analysis</i>
<i>hsp60</i>	Gene que codifica uma proteína chaperona de 60 kD

Inv	Do inglês, <i>invasin</i>
Kd	Quilodaltons
KV	Quilovolts
L	Levógiro
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
MILi	Ágar motilidade-indol-lisina
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
MLST	Do inglês, <i>multilocus sequence typing</i>
NAG	Não aglutinável
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não realizado
p	Pico
pb	Pares de base
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Do inglês, <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pYV	Do inglês, <i>plasmid for Yersinia virulence</i>
qPCR	PCR em tempo real ou quantitativo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
recA	Gene que codifica uma proteína de reparo e manutenção do DNA
REP	Do inglês, <i>repetitive extragenic palindrome</i>
rpoB	Subunidade β da RNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Do inglês, <i>single-nucleotide polymorphism</i>
SNPs	Do inglês, <i>single-nucleotide polymorphisms</i>
sodA	Gene que codifica uma proteína manganês-superóxido dismutase
spp.	Espécies
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
ssDNA	DNA fita-simples

TAE	Tris-acetado-EDTA
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
TRIS-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano hidrocloreto
TSI	Ágar <i>triple sugar iron</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
T	Timina
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
U	Unidades
UPGMA	Do inglês, <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
v	Volume
V	11 a 98% de amostras positivas
<i>virF</i>	Do inglês, <i>virulence regulon transcriptional activator</i>
XLD	Ágar xilose-lisina-desoxicolato
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
YadA	Do inglês, <i>Yersinia adhesin A</i>
Yops	Do inglês, <i>Yersinia outer proteins</i>
YPM	Do inglês, <i>Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen</i>
Yst	Do inglês, <i>Yersinia stable toxin</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

+	90% ou mais de amostras positivas
-	90% ou menos de amostras negativas
™	Trademark
%	Porcento
°C	Graus Centígrados
≥	Maior ou igual
>	Maior
<	Menor
ΔG	Energia de ligação
A/A	Pico ácido e base ácida
K/A	Pico alcalino e base ácida
H₂S	Ácido sulfídrico
N	Adenina, citosina, guanina e timina
R	Adenina e guanina
S	Citosina e guanina
Y	Citosina e timina
Lac-	Reação negativa para fermentação de lactose
Lac+	Reação positiva para fermentação de lactose
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
U.V.	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diferenciação fenotípica das espécies de <i>Yersinia</i>	3
Tabela 2.	Identificação bioquímica das biovariedades de <i>Y. pestis</i>	9
Tabela 3.	Susceptibilidade aos antibióticos encontrada nos diferentes biotipos de <i>Y. enterocolitica</i>	12
Tabela 4.	Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de <i>Y. enterocolitica</i> ...	13
Tabela 5.	Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	15
Tabela 6.	Determinantes de virulência encontrados em <i>Y. enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i>	20
Tabela 7.	Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de <i>Y. intermedia</i>	23
Tabela 8.	Classe de SNPs e mudança típica na temperatura de <i>melting</i> encontrada entre duas populações com mutações pontuais em uma determinada sequência	34
Tabela 9.	Características e procedência das 55 linhagens de <i>Yersinia</i> spp. utilizadas para a detecção de SNPs	41
Tabela 10.	Características e procedência das 40 linhagens de <i>Y. pseudotuberculosis</i> genotipadas por HRMA	43
Tabela 11.	Características e procedência das 50 linhagens de <i>Y. enterocolitica</i> genotipadas por HRMA	45
Tabela 12.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> e temperaturas de hibridação utilizados para os cinco genes sequenciados	50
Tabela 13.	Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA, <i>glnA</i> , <i>gyrB</i> , <i>hsp60</i> e <i>recA</i> para sequenciamento	51
Tabela 14.	Números de acesso no GenBank/EMDL/DDBJ das sequências de <i>Yersinia</i> spp. utilizadas para a identificação dos SNPs presentes nos <i>loci</i> estudados	54
Tabela 15.	Descrição dos reagentes utilizados para a otimização da temperatura de hibridação para os <i>primers</i> construídos	60
Tabela 16.	Descrição dos reagentes utilizados para as reações de PCR em tempo real	61

Tabela 17.	Número de SNPs passíveis de serem diferenciados por HRMA encontrados nos fragmentos gênicos analisados em cada uma das espécies de <i>Yersinia</i> estudadas	72
Tabela 18.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. pseudotuberculosis</i> por HRMA	73
Tabela 19.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA	74
Tabela 20.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. bercovieri</i> por HRMA	75
Tabela 21.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. intermedia</i> por HRMA	76
Tabela 22.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. mollaretii</i> por HRMA	76
Tabela 23.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. ruckeri</i> por HRMA	77
Tabela 24.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a genotipagem de <i>Y. rohdei</i> por HRMA	77
Tabela 25.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de <i>Y. pseudotuberculosis</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	100
Tabela 26.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de <i>Y. enterocolitica</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	102
Tabela 27.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das três linhagens de <i>Y. bercovieri</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	104
Tabela 28.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de <i>Y. intermedia</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	105
Tabela 29.	Nucleotídeos encontrados no SNP das quatro linhagens de <i>Y. mollaretii</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	107

Tabela 30.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das três linhagens de <i>Y. ruckeri</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	108
Tabela 31.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das quatro linhagens de <i>Y. rohdei</i> utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de <i>Yersinia</i>	110
Tabela 32.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das 40 linhagens de <i>Y. pseudotuberculosis</i> genotipadas por HRMA	111
Tabela 33.	Nucleotídeos encontrados nos SNPs das 50 linhagens de <i>Y. enterocolitica</i> genotipadas por HRMA	115
Tabela 34.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados para a diferenciação de <i>Y. pseudotuberculosis</i> de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Agentes intercalantes de DNA saturantes e não saturantes	30
Figura 2.	Dados de fluorescência mostrando uma redução linear da fluorescência a baixas temperaturas seguida por uma rápida redução ao redor da temperatura de <i>melting</i> característica do <i>amplicon</i>	32
Figura 3.	Análise de <i>melting</i> de um DNA heterozigoto	34
Figura 4.	Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%	67
Figura 5.	Gel representativo dos produtos de amplificação dos genes 16S rRNA, <i>glnA</i> , <i>gyrB</i> , <i>hsp60</i> e <i>recA</i> seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%	68
Figura 6.	Fragmentos representativos em formato de eletroferograma de sequências do fragmento 16S rRNA referente à linhagem <i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610 ^T obtidos após o sequenciamento	69
Figura 7.	Alinhamento de sequências pelo programa <i>ChromasPro</i> versão 1.5 de duas sequências <i>forward</i> e duas sequências <i>reverse</i> do fragmento 16S rRNA referente à linhagem <i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833 ^T para a obtenção da sequência consenso	70
Figura 8.	Alinhamento de sequências do gene 16S rRNA das linhagens representativas de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	71
Figura 9.	Produtos de amplificação do par de <i>primers glnA</i> -SNP4 de <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes temperaturas de hibridação após eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5%	78
Figura 10.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	79
Figura 11.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP1 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	80
Figura 12.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP2 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	80
Figura 13.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP3 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	81

Figura 14.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP1-2 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	81
Figura 15.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP3 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	82
Figura 16.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP4 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	82
Figura 17.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP1 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	83
Figura 18.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP2 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	83
Figura 19.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de <i>Y. enterocolitica</i>	84
Figura 20.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP1 de <i>Y. enterocolitica</i>	85
Figura 21.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP2-3 de <i>Y. enterocolitica</i>	85
Figura 22.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP4 de <i>Y. enterocolitica</i>	86
Figura 23.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP2-3 de <i>Y. enterocolitica</i>	86
Figura 24.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP4-5 de <i>Y. enterocolitica</i>	87
Figura 25.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP1 de <i>Y. enterocolitica</i> após a construção do heteroduplex com DNA da linhagens ATCC 9610 ^T	87
Figura 26.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de <i>Y. bercovieri</i>	88
Figura 27.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP2 de <i>Y. bercovieri</i>	89
Figura 28.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP3 de <i>Y. bercovieri</i>	89
Figura 29.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP1 de <i>Y. bercovieri</i>	90

Figura 30.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP1-2 de <i>Y. bercovieri</i>	90
Figura 31.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP3 de <i>Y. bercovieri</i>	91
Figura 32.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP1 de <i>Y. bercovieri</i>	91
Figura 33.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP1 de <i>Y. bercovieri</i>	92
Figura 34.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de <i>Y. intermedia</i>	93
Figura 35.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP1 de <i>Y. intermedia</i>	93
Figura 36.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP1 de <i>Y. intermedia</i>	94
Figura 37.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP1 de <i>Y. intermedia</i>	94
Figura 38.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de <i>Y. mollaharii</i>	95
Figura 39.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP1-2 de <i>Y. ruckeri</i>	96
Figura 40.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>gyrB</i> -SNP1 de <i>Y. rohdei</i>	97
Figura 41.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>hsp60</i> -SNP1 de <i>Y. rohdei</i>	97
Figura 42.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP1 de <i>Y. rohdei</i>	98
Figura 43.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP2 de <i>Y. rohdei</i>	98
Figura 44.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>recA</i> -SNP3 de <i>Y. rohdei</i>	99
Figura 45.	Análise da curva de <i>melting</i> normalizada do fragmento <i>glnA</i> -SNP1 de <i>Y. rohdei</i> após a construção do heteroduplex com DNA da linhagens ATCC 43380 ^T	99

- Figura 46.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 101
- Figura 47.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 103
- Figura 48.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, 16S rRNA-SNP2, 16S rRNA-SNP3, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *hsp60*-SNP1 e *recA*-SNP1, nessa ordem, para as três linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 104
- Figura 49.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1 e *hsp60*-SNP1, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. intermedia* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 106
- Figura 50.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados no SNP do fragmento 16S rRNA-SNP1 para as quatro linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 107
- Figura 51.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs do fragmento *gyrB*-SNP1-2 para as três linhagens de *Y. ruckeri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 109

- Figura 52.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1, *hsp60*-SNP1, *recA*-SNP1, *recA*-SNP2 e *recA*-SNP3, nessa ordem, para as quatro linhagens de *Y. rohdei* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* 110
- Figura 53.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para cada uma das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA 114
- Figura 54.** Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5, nessa ordem, para cada uma das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA 118
- Figura 55.** Alinhamento de sequências do gene 16S rRNA das linhagens “tipo” de cada uma das espécies de *Yersinia* mostrando uma região altamente variável flanqueada por regiões altamente conservadas 119
- Figura 56.** Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento do gene 16S rRNA utilizado para a diferenciação de *Y. enterocolitica* de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA 121

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. Introdução	1
1.1. História, taxonomia e características do gênero <i>Yersinia</i>	2
1.2. <i>Yersinia pestis</i>	7
1.3. <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	10
1.4. <i>Yersinia ruckeri</i>	20
1.5. <i>Yersinia frederiksenii</i>	21
1.6. <i>Yersinia kristensenii</i>	22
1.7. <i>Yersinia aldovae</i>	22
1.8. <i>Yersinia intermedia</i>	23
1.9. <i>Yersinia rohdei</i>	24
1.10. <i>Yersinia mollaretii</i>	24
1.11. <i>Yersinia bercovieri</i>	24
1.12. <i>Yersinia aleksiciae</i>	25
1.13. <i>Yersinia massiliensis</i>	25
1.14. <i>Yersinia similis</i>	26
1.15. <i>Yersinia entomophaga</i>	26
1.16. <i>Yersinia pekkanenii</i>	26
1.17. <i>Yersinia nurmii</i>	27
1.18. Tipagem molecular de <i>Yersinia</i> spp.	27
1.19. Genotipagem bacteriana baseada em <i>high-resolution melting analysis</i>	28
2. Relevância do estudo	36

3.	Objetivos	38
3.1.	Objetivo geral	39
3.2.	Objetivos específicos	39
4.	Material e Métodos	40
4.1.	Linhagens bacterianas	41
4.2.	Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica	47
4.3.	Reconfirmação dos biotipos	47
4.4.	Reconfirmação sorológica	47
4.5.	Armazenamento das linhagens bacterianas	48
4.6.	Extração do DNA genômico	48
4.7.	Identificação dos SNPs nas diferentes espécies de <i>Yersinia</i> estudadas	50
4.8.	Construção dos <i>primers</i>	58
4.9.	Otimização da temperatura de hibridação para os <i>primers</i> construídos	60
4.10.	Determinação dos SNPs por HRMA	61
4.11.	Construção dos dendrogramas de similaridade genética	63
4.12.	Genotipagem de <i>Y. pseudotuberculosis</i> por HRMA	63
4.13.	Genotipagem de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA	63
4.14.	Diferenciação de <i>Y. pseudotuberculosis</i> de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA .	64
5.	Resultados	65
5.1.	Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica	66
5.2.	Reconfirmação sorológica e dos biotipos	66
5.3.	Extração do DNA genômico	66
5.4.	Identificação dos SNPs nas diferentes espécies de <i>Yersinia</i> estudadas	67
5.5.	Construção dos pares de <i>primers</i>	72
5.6.	Otimização da temperatura de hibridação dos pares de <i>primers</i> construídos	78
5.7.	Determinação dos SNPs por HRMA	79
5.7.1.	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	79
5.7.2.	<i>Y. enterocolitica</i>	84
5.7.3.	<i>Y. bercovieri</i>	88
5.7.4.	<i>Y. intermedia</i>	92

5.7.5.	<i>Y. mollaretii</i>	95
5.7.6.	<i>Y. ruckeri</i>	95
5.7.7.	<i>Y. rohdei</i>	96
5.8.	Construção dos dendrogramas de similaridade genética	100
5.8.1.	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	100
5.8.2.	<i>Y. enterocolitica</i>	101
5.8.3.	<i>Y. bercovieri</i>	103
5.8.4.	<i>Y. intermedia</i>	105
5.8.5.	<i>Y. mollaretii</i>	106
5.8.6.	<i>Y. ruckeri</i>	108
5.8.7.	<i>Y. rohdei</i>	109
5.9.	Genotipagem de <i>Y. pseudotuberculosis</i> por HRMA	111
5.10.	Genotipagem de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA	115
5.11.	Diferenciação de <i>Y. pseudotuberculosis</i> de <i>Y. enterocolitica</i> por HRMA .	119
6.	Discussão	122
7.	Conclusões	133
8.	Referências bibliográficas	135
9.	Apêndices	154

1. Introdução

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”
(Carl Gustave Jung)

1. INTRODUÇÃO

1.1. História, taxonomia e características do gênero *Yersinia*

O gênero *Yersinia* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales* e família *Enterobacteriaceae* (BOTTONE, 1997) e, atualmente, é composto por 17 espécies (DRUMMOND et al., 2012).

As espécies pertencentes ao gênero não fazem parte da microbiota humana. As três espécies comprovadamente patogênicas para o homem são *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Enquanto *Y. pestis* causa uma infecção sistêmica grave conhecida como peste, as espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* geralmente causam uma gastroenterite auto-limitada. *Y. ruckeri* sorogrupo O:1 é um importante patógeno de peixes. As demais espécies de *Yersinia* são consideradas espécies ambientais e, usualmente, não-patogênicas para humanos. Entretanto, é crescente o número de relatos do isolamento dessas espécies de *Yersinia* de pacientes com distúrbios gastrointestinais (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; STENSETH et al., 2008; SULAKVELIDZE, 2000).

Um quadro de diferenciação fenotípica, apresentado na Tabela 1, pode ser utilizado para a diferenciação fenotípica das espécies desse gênero bacteriano.

Tabela 1. Diferenciação fenotípica das espécies de *Yersinia* (HURST et al., 2011; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011a; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011b; SOUZA et al., 2011)

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	D-rafinose
<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

A espécie atualmente conhecida como *Yersinia pseudotuberculosis* foi isolada pela primeira vez em 1883, por Mallassez e Vignal, que a denominaram bacilo da tuberculose zoogleica, ao observarem o que lhes pareceram lesões tuberculosas em cobaias inoculadas com material purulento de uma criança que havia morrido de uma aparente meningite tuberculosa. Durante meio século após seu primeiro relato, *Y. pseudotuberculosis* foi isolada somente de roedores e pássaros. Até a década de 1950, apenas dois casos humanos haviam sido relatados, um caso de septicemia em 1909 e um de linfadenite mesentérica em 1916 (CARNIEL, 2003; FALCÃO; FALCÃO, 2006).

O agente da peste ou praga, *Yersinia pestis* (previamente denominado *Bacterium pestis*, *Bacillus pestis* e *Pasteurella pestis*), foi identificado pela primeira vez em 1894 por Alexandre Emile Jean Yersin a partir de material clínico aspirado de linfonodos de vítimas fatais de peste durante a Terceira Pandemia de Peste em Hong Kong. Posteriormente, ele mesmo demonstrou que camundongos e ratos inoculados com culturas puras desse cocobacilo Gram-negativo produziam sintomas semelhantes aos sintomas da peste e evoluíam para morte. Quatro anos mais tarde, em 1898, enquanto investigavam o avanço da epidemia de peste na Índia, Paul-Louis Simond e Masanori Ogata demonstraram, independentemente, a importância da pulga como vetor de transmissão da doença entre roedores e humanos (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Schleifstein e Coleman (1939) descreveram cinco isolados bacterianos semelhantes ao *Bacillus lignieri* e *Pasteurella pseudotuberculosis*. Dois desses isolados foram obtidos a partir de lesões faciais e três foram obtidos a partir de material intestinal de humanos com sintomas de enterite. Os isolados eram antigenicamente relacionados e altamente virulentos para ratos. Os autores concluíram que os isolados pertenciam a uma espécie bacteriana ainda não identificada e, pelo fato de três das cinco linhagens terem sido isoladas de conteúdo entérico propuseram o nome de *Bacterium enterocoliticum*.

Em 1944, através de observações de peculiaridades fenotípicas apresentadas pela então denominada *Pasteurella pestis* foi-se proposto a criação de um novo gênero na família *Enterobacteriaceae*, denominado *Yersinia*, em homenagem ao bacteriologista francês Alexandre Yersin (VAN LOGHEM, 1944). Entretanto, somente em 1964 e em 1965, as espécies *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* foram, respectivamente, incluídas no gênero (FREDERIKSEN, 1964; SMITH; THAL, 1965).

A taxonomia do gênero *Yersinia* foi revolucionada por Brenner et al. (1976) que aplicaram a técnica de hibridação DNA-DNA em adição aos clássicos testes bioquímicos utilizados para a classificação de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Como resultado desse estudo, um grupo de bactérias classificadas como *Y. enterocolitica* foi realocado em um segundo grupo, inicialmente denominado de *Y. enterocolitica-like* baseado em características fenotípicas e também nas relações DNA-DNA apresentadas por esses micro-organismos. Subsequentemente, esses micro-organismos originaram as espécies *Y. frederiksenii* (URSING et al., 1980), *Y. intermedia* (BRENNER et al., 1980), *Y. kristensenii* (BERCOVIER et al., 1980), *Y. aldovae* (BERCOVIER et al., 1984), *Y. rohdei* (ALEKSIC et al., 1987), *Y. bercovieri* (WAUTERS et al., 1988) e *Y. mollaretii* (WAUTERS et al., 1988).

Os membros do gênero *Yersinia* têm um conteúdo de G + C variando de 46 a 50%. As relações DNA-DNA entre as espécies do gênero são muito diversas, variando, usualmente, de 55 a 74%, com exceção de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, que apresentam mais de 90% de similaridade entre si (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Yersinia é um bacilo Gram-negativo não formador de esporos. O bacilo é menor que os demais membros da família, medindo de 0,5 a 0,8 µm de diâmetro e de 1 a 3 µm de comprimento e tende a crescer mais lentamente. Com exceção de *Y. pestis* e *Y. pekkannenii* que são imóveis e *Y. ruckeri* que apresenta motilidade variável, todos os outros membros do gênero são móveis a temperatura de 25°C, pela presença de flagelos peritríquios ou

peripolares, e imóveis a 37°C (FOUZ; ZARZA; AMARO, 2006; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011b; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

As bactérias do gênero *Yersinia* são anaeróbias facultativas e multiplicam-se em uma ampla faixa de temperatura, variando de 4 a 43°C, embora as condições ótimas de multiplicação *in vitro* sejam observadas entre 25 e 28°C. Por essa razão, é recomendável que a identificação fenotípica das espécies de *Yersinia* seja realizada a 25-28°C (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; SULAKVELIDZE, 2000).

Os membros do gênero *Yersinia* fermentam a glicose com produção de ácido, mas sem produção de gás, são catalase positiva, oxidase negativa, não são hemolíticas 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 *Salmonella-Shigella* (SS) e ágar MacConkey quando incubados a 37°C em condições de aerofilia, mas podem ser suplantadas por outras bactérias em amostras de origem clínica e, principalmente, de origem ambiental. Nesses meios de cultivo, as colônias são muito pequenas, arredondas, opacas, incolores, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro após 24 horas de incubação. O uso de outros meios de isolamento de enterobactérias como ágar SS-desoxicolato, ágar Hektoen entérico, ágar eosina-azul de metileno (EMB) e ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) não fornece nenhuma vantagem para o isolamento de *Y. enterocolitica* e para a diferenciação das demais espécies de *Yersinia* dos outros micro-organismos presentes na microbiota fecal (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Devido à sua habilidade de fermentar sacarose e ao fato de crescer mais lentamente que os demais membros da família *Enterobacteriaceae*, é recomendável o uso de um meio de cultura diferencial e seletivo para o cultivo das espécies oriundas de sítios não estéreis. O meio seletivo usualmente utilizado para o isolamento de *Yersinia* spp. é o ágar CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina). As colônias típicas desses micro-organismos em ágar CIN

apresentam centro côncavo e vermelho, circundado por uma borda transparente, dando o aspecto de “olhos de touro”. Entretanto, algumas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. bercovieri* podem ser inibidas quando cultivadas em ágar CIN (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

1.2. *Yersinia pestis*

A peste ou praga, umas das mais devastadoras doenças da história humana, é causada por *Y. pestis* e é, primariamente, uma doença zoonótica que afeta roedores e outros mamíferos selvagens. Usualmente, a peste é transmitida pela picada de pulgas infectadas com o micro-organismo, embora a infecção também possa ocorrer pelo contato com gotículas respiratórias de indivíduos infectados (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Embora sejam reportadas mais de 200 espécies de mamíferos naturalmente infectadas por peste, os roedores são os hospedeiros mais importantes de *Y. pestis*. O vetor de transmissão mais comum e eficiente é a pulga *Xenopsylla cheopis*, entretanto, outras espécies de pulga também podem transmitir a peste (BUTLER, 2009; PERRY; FETHERSTON, 1997).

Y. pestis foi responsável por três pandemias ao longo da história humana. A primeira delas, denominada “Praga de Justiniano”, ocorreu entre os anos 541 e 767 d.C. e foi importada da África Central e Oriental para o Egito de onde se espalhou para todos os países ao redor do Mar Mediterrâneo com uma taxa de mortalidade estimada entre 15 e 40%. A segunda pandemia conhecida como “Morte Negra” e as subseqüentes epidemias ocorridas entre os séculos VIII e XIV d.C. foram importadas da Ásia Central e espalharam-se a partir do Mar Cáspio para toda a Europa. A “Morte Negra” foi responsável pela morte de, aproximadamente, 30 a 40% da população européia. A terceira pandemia de peste teve início em meados do século XIX na província chinesa de Yünnan e espalhou-se globalmente por via marítima a partir de Hong Kong em 1894, mesmo ano em que *Y. pestis* foi descrita como o

agente etiológico da peste por Alexandre Yersin. A taxa de mortalidade e de disseminação associadas à terceira pandemia de peste são consideravelmente menores quando comparadas às duas pandemias anteriores, devido, principalmente ao advento de políticas efetivas de saúde pública e ao uso de antibióticos a partir de 1950 (ACHTMAN et al., 1999; PERRY; FETHERSTON, 1997; STENSETH et al., 2008).

Atualmente, a infecção humana por *Y. pestis* é rara. Entretanto, a peste permanece enzoótica em partes da África, Américas do Norte e Sul e Ásia. O aumento do número de casos de peste em humanos e o reaparecimento de epidemias em alguns países como Malawi, Moçambique e Índia levaram à categorização da peste como uma doença reemergente (ACHTMAN et al., 1999; BUTLER, 2009; GUIYOULE et al., 1997; STENSETH et al., 2008).

Achtman et al. (1999) propuseram que *Y. pestis* emergiu como um clone de *Y. pseudotuberculosis* entre 1.500 e 20.000 anos atrás. Entretanto, a proposta de reclassificação de *Y. pestis* como uma subespécie de *Y. pseudotuberculosis* não tem sido implementada devido à importância histórica de *Y. pestis*, bem como às considerações de segurança em saúde pública associadas à peste e também às marcantes diferenças nas infecções causadas por *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Y. pestis é dividida nas biovariedades Antiqua, Medievalis, Orientalis e Microtus. As quatro biovariedades de *Y. pestis* podem ser identificadas através de sua habilidade de fermentar glicerol e arabinose e reduzir nitrato, conforme especificado na Tabela 2 (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

A biovariedade Antiqua é residente na África e descendente da bactéria que causou a Praga de Justiniano. A biovariedade Medievalis encontra-se na Ásia Central e foi responsável pela “Morte Negra”. A biovariedade Orientalis foi originada na China Meridional e está mundialmente disseminada sendo responsável pela peste moderna (ZHOU et al., 2004). As

linhagens de *Y. pestis* pertencentes as essas três biovariedades não apresentam diferenças em sua virulência ou patologia em animais e humanos (PERRY; FETHERSTON, 1997; STENSETH et al., 2008).

Tabela 2. Identificação bioquímica das biovariedades de *Y. pestis* após incubação a 25°C por 48 horas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011)

Biovariedade	Reações ^a		
	Glicerol	Nitrato	Arabinose
Antiqua	+	+	+
Medievalis	+	-	+
Orientalis	-	+	+
Microtus	+	-	-

^a +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas

Zhou et al. (2004) propuseram uma nova biovariedade de *Y. pestis* denominada Microtus e encontrada na China. Diferentemente das três biovariedades anteriores, a biovariedade Microtus apresenta um perfil genômico que a torna pouco virulenta para humanos devido à perda de alguns genes e ao aparecimento de pseudogenes associados à virulência de *Y. pestis*.

A infecção por *Y. pestis* manifesta-se primariamente sob as formas bubônica, pneumônica ou septicêmica. A peste bubônica é a forma clássica da doença. Os pacientes apresentam febre, dor de cabeça, calafrios e linfonodos extremamente inchados e dolorosos, conhecidos como bubões, tipicamente encontrados nas regiões inguinal e femoral. A mortalidade para casos de peste bubônica não tratada varia de 40 a 60%. A forma septicêmica primária de peste assemelha-se clinicamente a septicemias causadas por outros micro-organismos Gram-negativos. A taxa de mortalidade para pessoas com a forma septicêmica de peste é alta, variando de 30 a 50%. A forma pneumônica da doença é rara, mas é a forma mais

fatal da doença. É disseminada através de gotículas respiratórias pelo contato com indivíduos infectados. Essa forma progride rapidamente de um estado febril semelhante a um resfriado para uma pneumonia severa com tosse e produção de escarro sanguinolento. Tanto a forma septicêmica quanto a forma pneumônica quando não tratadas são, geralmente, fatais (BUTLER, 2009; PERRY; FETHERSTON, 1997).

A estreptomicina é o antibiótico de escolha para o tratamento de peste. Tetraciclina são utilizadas na terapia profilática e cloranfenicol é recomendado para o tratamento de meningite causada por *Y. pestis*. *Y. pestis* é susceptível a penicilinas *in vitro*, entretanto, esses antibióticos são considerados ineficazes *in vivo* (PERRY; FETHERSTON, 1997). O uso de ceftriaxona, doxiciclina, ciprofloxacino, ofloxacino e aminoglicosídeos também pode ser considerado como alternativas para o tratamento. Há somente dois relatos na literatura de isolados humanos resistentes às drogas usadas no tratamento de peste, ambos ocorridos em Madagascar em 1995 (BUTLER, 2009).

Diferentemente do *Bacillus anthracis* causador do antraz, *Y. pestis* não forma esporos e não sobrevive fora do corpo de pessoas e animais. Por essa razão, o desenvolvimento de um agente bioterrorista que utilize essa bactéria na forma de aerossóis torna-se difícil. Ademais, a capacidade da forma pneumônica de peste se propagar em uma epidemia é severamente restringida pela necessidade do contato próximo com uma pessoa com peste pneumônica. Embora a capacidade de *Y. pestis* causar pânico a torne um atrativo agente para o bioterrorismo, sua incapacidade de sobreviver por longo tempo no meio ambiente limita sua utilidade como uma arma biológica (BUTLER, 2009; ROLLINS; ROLLINS; RYAN, 2003).

1.3. *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*

A infecção causada por *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* é denominada yersiniose e é adquirida através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados. As duas

espécies podem causar desde uma enterite auto-limitada até infecções sistêmicas fatais. *Y. enterocolitica* é a espécie mais comumente relacionada à infecções humanas (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Após sua ingestão, tanto *Y. enterocolitica* quanto *Y. pseudotuberculosis* migram para a porção terminal do íleo. A maioria das bactérias permanece no lúmen intestinal enquanto uma minoria invade o tecido através das células M que recobrem os folículos linfóides intestinais (placas de Peyer). Após penetrar no epitélio intestinal, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, colonizam as Placas de Peyer e a lâmina própria, causando a destruição localizada dos tecidos e a formação de microabscessos. Através das vias linfáticas, a bactéria pode alcançar os linfonodos mesentéricos e, se conseguir escapar dos linfonodos e cair na corrente sanguínea, a bactéria alcançará órgãos mais distantes, sempre mostrando tropismo por tecidos linfóides, localizando-se preferencialmente no retículo-endotelial do fígado e do baço (ROBINS-BROWNE, 2001; SANSONETTI, 2004).

A gastroenterite é a forma mais frequente de yersiniose e ocorre, principalmente, em crianças abaixo de quatro anos no caso de *Y. enterocolitica* e em adolescentes e adultos jovens no caso de *Y. pseudotuberculosis*. A dose infecciosa é desconhecida, mas acredita-se que seja superior a 10^4 UFC/mL ou UFC/g. Os sintomas iniciam-se 24-48 horas após a ingestão e incluem diarreia, dor abdominal e febre. Algumas vezes, os sintomas sugerem uma apendicite aguda. Geralmente, os pacientes apresentam linfadenite mesentérica ou ileíte terminal. Complicações ocorridas após uma infecção não diagnosticada como artrite reativa, eritema nodoso, Síndrome de Reiter, uveíte, conjuntivite, uretrite, balanite e glomerulonefrite podem ocorrer (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; ROBINS-BROWNE, 2001; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

A maioria das gastroenterites e linfadenite mesentéricas causadas por *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* em pacientes imunocompetentes é auto-limitada,

necessitando apenas de reposição eletrolítica. Entretanto, infecções sistêmicas, infecções extra-intestinais e enterocolites em pacientes imunocomprometidos devem ser tratadas com antibioticoterapia (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007). Nesses casos, o tratamento das infecções causadas por *Y. pseudotuberculosis* deve ser baseado na administração de ampicilina, estreptomicina ou tetraciclina e nos casos de infecção por *Y. enterocolitica*, sulfametoxazol+trimetoprima ou fluoroquinolonas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Y. enterocolitica produz dois tipos de β -lactamases (A e B) que conferem resistência à ampicilina, cefalotina, carbenicilina e ticarcilina. Entretanto, diferenças na susceptibilidade aos β -lactâmicos são encontradas nos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica*, conforme especificado na Tabela 3, visto que diferentes biotipos de *Y. enterocolitica* possuem uma produção diferenciada dessas duas enzimas. Enquanto o bio-sorogrupo 4/O:3 de *Y. enterocolitica*, geralmente, produz as duas enzimas, a maioria das linhagens dos biotipos 2 e 3 não produzem a lactamase A, o que pode explicar a sensibilidade desses biotipos à carbenicilina e à ticarcilina. Em contra partida, *Y. pseudotuberculosis* é suscetível a penicilinas devido à sua incapacidade de produzir β -lactamases (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Tabela 3. Susceptibilidade aos antibióticos encontrada nos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007)

Antibiótico	Biotipos					
	1A	1B	2	3	4	5
Ampicilina	-	S ^a	R ^b	-	R	-
Amoxicilina/Clavulanato	R	S	R	R	S	S
Carbenicilina	R	R	S	S	R	-
Cefixima	R	S	R	R	S	S
Cefoxitina	R	S	R	R	S	S
Ticarcilina	R	R	S	S	R	R
Cefalotina	-	R	-	-	R	-

^a sensível; ^b resistente

Y. enterocolitica é uma espécie heterogênea que pode ser dividida em seis biotipos de acordo com seu comportamento frente a diferentes substratos (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007), conforme especificado na Tabela 4.

Tabela 4. Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de *Y. enterocolitica* após incubação a 25°C por 48 horas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011)

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

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

Os biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 incluem linhagens que são associadas a doenças em humanos, enquanto o biotipo 1A consiste, majoritariamente, de linhagens de origem ambiental. Entretanto, evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais sugerem que uma minoria de linhagens pertencentes ao biotipo 1A possa causar doença gastrointestinal em humanos (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

O esquema antigênico de *Y. enterocolitica* inclui 76 antígenos somáticos e 44 antígenos flagelares (WAUTERS et al., 1991) que é compartilhado com as outras espécies de *Yersinia*, com exceção de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. No entanto, só a caracterização dos antígenos somáticos é utilizada para o diagnóstico em laboratórios de rotina. Atualmente,

as linhagens patogênicas de *Y. enterocolitica* pertencem, principalmente, 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 e os bio-sorogrupos mais relacionados a doenças no homem incluem 4/O:3; 1B/O:8; 2/O:9 e 2/O:5,27 (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007). No Brasil já foi relatado o isolamento de *Y. enterocolitica* dos bio-sorogrupos 4/O:3; 1A/O:5; 2/O:5; 3/O:5,27; 1A/O:6,30 e 1A/O:8,19 a partir de fontes humanas (FALCÃO et al., 2008).

Há uma grande correlação entre bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* e o tipo de hospedeiro e a região de isolamento (ROBINS-BROWNE, 2001). A vasta maioria dos isolados clínicos pertence a relativamente poucos bio-sorogrupos. Linhagens do biotipo 1B sorogrupos O:4,32; O:8; O:13; O:18, O:20 e O:21 são frequentemente associadas a doenças humanas no Canadá e Estados Unidos (BOTTONE, 1999; DRUMMOND et al., 2012; HOSAKA et al., 1997; ICHINOHE et al., 1991; MARUYAMA, 1987). Linhagens de *Y. enterocolitica* que são responsáveis por infecções humanas na Europa, Japão, Canadá, Estados Unidos e Brasil pertencem, principalmente, ao bio-sorogrupo 4/O:3. Os sorogrupos O:9 e O:5,27 são amplamente distribuídos ao redor do mundo, assim como as linhagens não-patogênicas pertencentes ao biotipo 1A sorogrupos O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:10; O:18; O:46 e linhagens não tipáveis (BOTTONE, 1999; DRUMMOND et al., 2012; FALCÃO et al., 2008).

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; BRAULD, 1976). Devido à necessidade de manutenção de estoques de fagos biologicamente ativos e de linhagens controle, a fagotipagem está disponível apenas em poucos laboratórios (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Ratos, pássaros, porcos, cachorros e gatos são considerados os principais reservatórios de *Y. enterocolitica* e constituem, dessa forma, fontes de infecção para o homem. Alimentos,

como carnes, sorvetes e leite, têm sido frequentemente relacionados à transmissão de *Y. enterocolitica*, embora a maioria dos isolados dessas fontes não pertença aos bio-sorogrupos reconhecidamente patogênicos. *Y. enterocolitica* tem sido isolada também a partir de fontes ambientais como lagoas, lagos, esgoto e solo (DE BOER, 1995; DRUMMOND et al., 2012; FALCÃO et al., 2008; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; GREENWOOD; HOOPER; REDHOUSE, 1990; MARTÍNEZ et al., 2009; NOVOSLAVSKIJ et al., 2013; OKWORI et al., 2009).

Comparativamente a *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* é uma espécie fenotipicamente mais homogênea. Contudo, *Y. pseudotuberculosis* ainda pode ser dividida em quatro biotipos frente a sua resposta quanto à assimilação de citrato e fermentação de melibiose e rafinose (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007), conforme especificado na Tabela 5.

Tabela 5. Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de *Y. pseudotuberculosis* após incubação a 25°C por 48 horas (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007)

Reações ^a	Biotipos			
	1	2	3	4
Melibiose	+	-	-	+
Citrato	-	-	+	-
Rafinose	-	-	-	+

^a +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas

Diferentemente de *Y. enterocolitica*, não existe uma correlação direta entre biotipos de *Y. pseudotuberculosis* e patogenicidade. Contudo, as linhagens melibiose positivas (biotipos 1 e 4) mostraram-se mais patogênicas que linhagens melibiose negativas (biotipos 2 e 3) (CH'NG et al., 2011; FUKUSHIMA et al., 2001; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2011).

Entretanto, algumas linhagens pertencentes ao biotipo 2 isoladas no Brasil foram responsáveis por causar diarreia severa em bovinos (WARTH; BIESDORF; DE SOUZA, 2012).

Um esquema antigênico simplificado para a sorotipagem de *Y. pseudotuberculosis* foi proposto por Tsubokura e Aleksic (1995). Esse sistema consiste de 15 antígenos somáticos (O:1 a O:15), sendo os sorogrupos O:1 e O:2 subdivididos em três subtipos (a, b e c) e os sorogrupos O:4 e O:5 subdivididos nos subtipos a e b.

Os sorogrupos de *Y. pseudotuberculosis* diferem em sua distribuição geográfica e nichos ecológicos. Sorogrupos O:1b e O:3 de *Y. pseudotuberculosis* tem sido isolados de pacientes no Canadá, enquanto os sorogrupos O:1a, O:1b e O:3 são mais frequentemente isolados de humanos na Europa. No Extremo Oriente, os sorogrupos O:1b, O:2a, O:2b, O:3, O:4a, O:4b, O:5a e O:5b tem sido isolados de amostras clínicas (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FUKUSHIMA et al., 2001). No Brasil, já foram isoladas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* pertencentes aos sorogrupos O:1a e O:3, todas oriundas de animais (FALCÃO et al., 2008). A relação entre patogenicidade e propriedades sorológicas de *Y. pseudotuberculosis* ainda permanece pouco compreendida. Entretanto, os sorogrupos O:1 a O:5 são mais frequentemente isolados de humanos, enquanto dos sorogrupos O:6 a O:15 tem sido mais isolados de animais selvagens e de amostras ambientais (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FUKUSHIMA, 2003).

Assim como *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* é amplamente encontrada na natureza. Seus principais reservatórios são roedores, pássaros selvagens, porcos e ruminantes (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; MARTÍNEZ et al., 2009; OKWORI et al., 2009).

Vários genes contribuem para a virulência de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Esses fatores de virulência são codificado tanto por genes plasmidiais contidos no plasmídeo de virulência pYV (*plasmid for Yersinia virulence*) quanto por genes cromossomais e sua expressão é temperatura-dependente (Tabela 6). Enquanto os genes

plasmidiais são normalmente expressos a 37°C os genes cromossomais são usualmente expressos a 25°C (ROBINS-BROWNE, 2001).

A presença do plasmídeo pYV garante a *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* a habilidade de sobreviver e multiplicar-se nos tecidos linfóides do hospedeiro. O plasmídeo pYV codifica uma adesina denominada YadA (*Yersinia adhesin A*) que induz a adesão da bactéria ao muco intestinal, colágeno, laminina e fibronectina e, posteriormente, a internalização da bactéria por endocitose. YadA tem também a função de inibir a resposta imune inata do hospedeiro, conferindo resistência à ação do sistema complemento. YadA é um importante fator de virulência de *Y. enterocolitica*, mas parece ser dispensável para a virulência de *Y. pseudotuberculosis* (EL TAHIR; SKURNIK, 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; EL TAHIR; KUUSELA; SKURNIK, 2000). O plasmídeo pYV codifica também um conjunto de proteínas regulatórias denominadas Yops (*Yersinia outer proteins*) que conferem às linhagens de *Yersinia* a capacidade de resistir à resposta imune não específica do hospedeiro (CORNELIS, 1998; CORNELIS et al., 1998; VIBOUD; BLISKA, 2005). No plasmídeo pYV localiza-se também o gene *ysc*, responsável pela secreção das proteínas necessárias para a construção da maquinaria funcional de um sistema de secreção do tipo III (T3SS) encontrado em *Yersinia*. O T3SS é responsável por injetar diretamente as Yops no citoplasma da célula do hospedeiro (CORNELIS, 2002; DRUMMOND et al., 2012).

A invasão de células epiteliais por *Yersinia* requer pelo menos dois genes cromossomais, denominados *inv* (*invasion*) e *ail* (*adhesion invasion locus*) (MILLER; FALKOW, 1988). O gene *inv* codifica uma proteína de membrana externa denominada Inv responsável pela entrada de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* nas células epiteliais do íleo nos estágios iniciais da infecção (ISBERG; BARNES, 2001). Esse gene é encontrado no cromossomo de todas as linhagens de *Yersinia* spp., com exceção de *Y. ruckeri*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii* e *Y. pekkanenii* (MURROS-KONTIAINEN et al., 2011a; MURROS-

KONTIAINEN et al., 2011b; SOUZA; FALCÃO, 2012b; SULAKVELIDZE, 2000), mas é funcional apenas nas espécies patogênicas de *Yersinia* (CARNIEL, 1995). Por outro lado, o gene *ail* codifica uma proteína de superfície denominada Ail que medeia a resistência aos efeitos bactericidas do complemento em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* e adesão e invasão nos bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* associados a doenças (ROBINS-BROWNE, 2001).

Outros fatores de virulência codificados por genes cromossomais são também importantes para a virulência de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. A produção de fímbrias que participam da aderência da bactéria ao epitélio intestinal é determinada pelo gene *myf* em *Y. enterocolitica* e pelo gene *psa* em *Y. pseudotuberculosis* (CARNIEL, 1995; IRIARTE et al., 1993). A presença da ilha de alta patogenicidade (HPI) no cromossomo *Y. enterocolitica* 1B e algumas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* confere a bactéria a capacidade de quelar o ferro ligado a proteínas eucarióticas e utilizá-lo para sua multiplicação (CARNIEL, 1995; KOORNHOF; SMEGO; NICOL, 1999; RAKIN et al., 1999). O gene *ure* é responsável pela síntese da enzima urease, a qual hidrolisa a uréia para formar ácido carbônico e amônia, permitindo à bactéria escapar da barreira ácida estomacal e causar doença (DE KONING-WARD; ROBINS-BROWNE, 1995). A síntese do lipopolissacarídeo (LPS) em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* é codificada pelo locus *rfb* e regulada pela temperatura. Ao multiplicarem-se a 25°C, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* possuem um LPS liso e expressam a cadeia completa do antígeno O, enquanto que ao multiplicarem-se a 37°C apresentam células rugosas devido à repressão da síntese do LPS. O LPS liso estimula 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 rugoso 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 de a bactéria sobreviver nos tecidos, permitindo-lhe expor na superfície seus determinantes de virulência no período apropriado da infecção (ROBINS-BROWNE, 2001; SKURNIK; BENGOCHEA, 2003).

Diferentemente dos determinantes de virulência de origem cromossômica citados anteriormente, alguns genes são exclusivos de *Y. enterocolitica* e outros de *Y. pseudotuberculosis*. As sorovariedades patogênicas de *Y. enterocolitica* expressam uma enterotoxina termoestável denominada YstA que é codificada pelo gene *ystA* e responsável por causar diarreia. Além da proteína YstA, foi caracterizada uma outra enterotoxina denominada YstB, codificada pelo gene *ystB*, que acredita-se também causar diarreia (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; ROBINS-BROWNE, 2001). Somente *Y. pseudotuberculosis* produz uma toxina superantigênica codificada pelo gene *ypm* e conhecida como YPM. Foi confirmado experimentalmente que YPM é um fator de virulência que exacerba a toxicidade de *Y. pseudotuberculosis* em infecções sistêmicas, mas não em gastroenterites (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FUKUSHIMA et al., 2001).

Na infecção por linhagens enteropatogênicas de *Yersinia* ocorre uma relação primorosamente afinada entre a temperatura e as características de virulência da bactéria. Para provocar infecção, o micro-organismo precisa em primeiro lugar adaptar seus antígenos de superfície codificados a 25°C para resistirem ao aumento de temperatura que é encontrado no organismo do hospedeiro. Como são ingeridas normalmente a partir de fontes de origem alimentar fria, as linhagens virulentas utilizam determinantes mediados por genes cromossomais, expressos a baixas temperaturas para estabelecer a colonização. A aclimação à temperatura das células dos mamíferos resulta no aparecimento de outros determinantes cromossomais e de vários determinantes plasmidiais que são gradualmente expressos para contrabalançar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Esse ciclo quente-frio de transmissão se completa quando os microabscessos das criptas intestinais se rompem, possibilitando à

bactéria ter acesso novamente ao meio ambiente através das fezes, contaminando alimentos e água (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

Tabela 6. Determinantes de virulência encontrados em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007)

Determinante	Função	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>yop</i> ^a	Resistência à fagocitose	+	+
<i>yadA</i> ^a	Adesão e invasão	+	-
<i>inv</i> ^b	Adesão e invasão	+	+
<i>ail</i> ^b	Adesão e invasão	+	-
	Resistência ao complemento	+	+
<i>yst</i> ^b	Secreção de fluidos no intestino	+	-
<i>myf</i> ^b	Adesão	+	-
<i>psa</i> ^b	Adesão e resistência ao complemento	-	+
<i>ypm</i> ^b	Aumento da toxicidade em infecções sistêmicas	-	+
HPI ^b	Síntese de sideróforos	+	+
<i>ure</i> ^b	Hidrólise da uréia	+	+
<i>rfb</i> ^b	Síntese do LPS	+	+

^a marcadores plasmidiais; ^b marcadores cromossomais;

1.4. *Yersinia ruckeri*

Y. ruckeri foi descrita por Ewing et al. (1978). Contudo, seu *status* taxonômico ainda permanece controverso. Por ser a espécie menos relacionada filogeneticamente às demais espécies do gênero, alguns pesquisadores sugerem que essa espécie não deva ser incluída no gênero *Yersinia* (SULAKVELIDZE, 2000).

Y. ruckeri é um dos agentes etiológicos da “Doença da Boca Vermelha” em trutas (*Oncorhynchus mykiss*), mas também é responsável por septicemia fatal em carpas e outros peixes. A doença da boca vermelha é caracterizada por hemorragia subcutânea na boca, barbatanas e olhos e, eventualmente, erosão da mandíbula e do palato. A hemorragia também ocorre nos órgãos internos e nos estágios mais avançados o abdômen se enche de líquido. O peixe apresenta um comportamento anormal e inapetência. As taxas de mortalidade geralmente são elevadas. A doença é vista em fazendas de peixe com má qualidade de água. Essa espécie de *Yersinia* pode sobreviver por longos períodos no ambiente após um surto da doença e constituir um novo foco de infecção (SULAKVELIDZE, 2000).

Em um recente estudo publicado por Bastardo; Ravelo; Romalde (2012), conclui-se que a espécie apresenta elevada diversidade genética ao contrário do que se acreditava até pouco tempo atrás.

1.5. *Yersinia frederiksenii*

A espécie *Y. frederiksenii* foi descrita por Ursing et al. (1980) a partir de um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* que apresentavam a capacidade de fermentar ramnose. Desde sua descrição, a espécie tem sido caracterizada como uma espécie geneticamente heterogênea, formada por três grupos genômicos ou genoespécies separados por grande distância genética (DOLINA; PEDUZZI, 1993). Entretanto, devido à dificuldade de separar-se essas três genoespécies usando testes bioquímicos e ao pequeno número de linhagens estudadas no momento em que a classificação foi anunciada, decidiu-se que os grupos genômicos deveriam ser mantidos dentro da espécie *Y. frederiksenii* (DEMARTA et al., 2004). *Y. frederiksenii* tem sido isolada a partir de água, esgoto, solo, peixes, roedores selvagens, alimentos, animais domésticos e humanos saudáveis e doentes. Os sorogrupos mais

predominantes são O:16, O:1 e O:2 (SULAKVELIDZE, 2000). No Brasil, os sorogrupos mais comuns são o O:16 e O:40 (FALCÃO et al., 2008).

1.6. *Yersinia kristensenii*

A espécie *Y. kristensenii* foi descrita por Bercovier et al. (1980) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* trealose positivas e sacarose e ramnose negativas. Assim como *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* é uma espécie bastante heterogênea com alguns isolados sendo filogeneticamente mais relacionados a *Y. mollaretii*. Os sorogrupos mais comuns são o O:12, O:28 e O:11. As linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* tem sido isoladas de água, solo, alimentos, animais e humanos saudáveis e doentes (SULAKVELIDZE, 2000). No Brasil, o sorogrupo mais comuns é o O:61 (FALCÃO et al., 2008).

1.7. *Yersinia aldovae*

A espécie *Y. aldovae* foi descrita por Bercovier et al. (1984) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* ramnose positivas e sorbose, celobiose, melibiose e rafinose negativas. Uma característica interessante dessa espécie de *Yersinia* é a reação de Voges-Proskauer positiva a 25°C e negativa a 37°C. Os sorogrupos mais comuns são o O:17; O:6,31; O:6,30; O:7,8; O:21 e O:22. Filogeneticamente, *Y. aldovae* aparece mais relacionada a *Y. frederiksenii* e *Y. bercovieri*. Tem sido isolada de ecossistemas aquáticos e solos. Das espécies de *Y. enterocolitica-like* é a única espécie ainda não relacionada a infecções humana ou animal (SULAKVELIDZE, 2000).

1.8. *Yersinia intermedia*

A espécie *Y. intermedia* foi descrita por Brenner et al. (1980) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* ramnose, melibiose, rafinose, α -metil-D-glicosídeo e ornitina descarboxilase positivas. Os sorogrupos O:4 e O:17 são os mais predominantes, entretanto, a maioria das linhagens de *Y. intermedia* não é sorotipável pelo esquema de Wauters et al. (1991). É uma espécie bioquimicamente heterogênea, que pode ser dividida em 10 biotipos de acordo com características fenotípicas conforme descrito na Tabela 7. Tem sido isolada principalmente de água, peixes, ostra, camarão, caramujos, animais selvagens e domésticos, alimentos e humanos, incluindo pessoas com desordens gastrintestinais (SULAKVELIDZE, 2000). 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 7. Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de *Y. intermedia* após incubação a 25°C por 48 horas (MARTIN et al., 2009)

Biotipos	Reações ^a				Utilização de citrato de Simmons
	Fermentação				
	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

1.9. *Yersinia rohdei*

A espécie *Y. rohdei* foi descrita por Aleksic et al. (1987) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* citrato e sacarose positivas e Voges-Proskauer, indol e ramnose negativas. Filogeneticamente, *Y. rohdei* é mais relacionada a *Y. frederiksenii*; entretanto, diferentemente desta última, todas as linhagens de *Y. rohdei* mostram-se altamente relacionadas. A espécie pode ser dividida em dois biotipos. O biotipo 1 fermenta a rafinose e a melibiose e o biotipo 2 não fermenta esses carboidratos. A maioria das linhagens dessa espécie não possui o antígeno somático tipável pelo esquema de Wauters et al. (1991). Entretanto algumas linhagens compartilham os antígenos O:38 e O:60 com *Y. frederiksenii* e o antígeno O:18 com *Y. enterocolitica*. *Y. rohdei* tem sido isolada de água e fezes de cachorro e humanos, incluindo pessoas com diarreia e câibras intestinais (SULAKVELIDZE, 2000).

1.10. *Yersinia mollaretii*

A espécie *Y. mollaretii* foi descrita por Wauters et al. (1988) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* pirazinamidase, mucato, prolina peptidase, xilose e sorbose positivas e Voges-Proskauer e fucose negativas. *Y. mollaretii* compartilha alguns antígenos somáticos com *Y. enterocolitica* e outras espécies de *Y. enterocolitica-like*, como os antígenos O:6,30 e O:3. A espécie tem sido isolada de carne, vegetais crus, águas de beber e recreacionais e, ocasionalmente de humanos, incluindo pacientes com diarreia (SULAKVELIDZE, 2000).

1.11. *Yersinia bercovieri*

A espécie *Y. bercovieri* foi descrita por Wauters et al. (1988) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* pirazinamidase, mucato, prolina peptidase, xilose e fucose positivas e Voges-Proskauer e sorbose negativas. *Y. bercovieri* apresenta um antígeno

somático quimicamente distinto das demais *Y. enterocolitica-like* e também de *Y. enterocolitica*, denominado O:10. A espécie tem sido isolada de humanos saudáveis e pacientes com diarreia bem como de alimentos cruos e fontes ambientais (SULAKVELIDZE, 2000).

1.12. *Yersinia aleksiciae*

A espécie *Y. aleksiciae* foi descrita por Sprague; Neubauer (2005) a partir de cinco linhagens fenotipicamente classificadas como *Y. kristensenii*. Estudos de hibridação DNA-DNA, de sequenciamento do gene 16S rRNA que identificou uma região específica nesse gene encontrada apenas nesses cinco isolados (5'-AAGGGTTCAGTGTTAATAGCACTGAGCATT-3' representando as posições 451-480 de *E. coli*) e da presença de atividade de lisina descarboxilase levaram à proposição dessa nova espécie de *Yersinia*. Os membros dessa nova espécie foram isolados a partir de fezes de humanos, ratos, toupeiras, renas e porcos, bem como de produtos lácteos na Europa, América, Austrália e Ásia. O sorogrupo O:16 parece ser um marcador específico dessa espécie.

1.13. *Yersinia massiliensis*

A espécie *Y. massiliensis* foi descrita inicialmente por Merhej et al. (2008) a partir de dois organismos isolados em Marselha na França, baseados em características fenotípicas e no sequenciamento dos genes 16S rRNA, *hsp60*, *gyrB*, *sodA* e *rpoB*. Posteriormente, Souza; Falcão; Falcão (2011) descreveram quatro novas linhagens isoladas no Brasil e Argentina e sugeriram uma revisão das características fenotípicas dessa espécie de *Yersinia*. Os membros dessa espécie de *Yersinia* já foram isolados de água de diálise, água doce, leite pasteurizado e alface e não possuem os marcadores de virulência clássicos de *Yersinia*, *inv*, *ail*, *ystA* e *virF* e, portanto, parecem ser linhagens não-patogênicas para humanos (SOUZA; FALCÃO, 2012b).

1.14. *Yersinia similis*

Algumas linhagens fenotipicamente identificadas como membros da espécie *Y. pseudotuberculosis* foram submetidas a uma classificação mais detalhada empregando a análise da sequência do gene 16S rRNA, hibridação DNA-DNA e análise de características fenotípicas. Com base nos valores de hibridação DNA-DNA, numa sequência específica encontrada no gene 16S rRNA (5'-GATTGGCAGAGATGCCTTA-3' representando as posições 987-1006 de *E. coli*) e na ausência de fermentação de melibiose, a espécie *Y. similis* foi proposta por Sprague et al. (2008). As linhagens pertencentes a essa espécie são bem adaptadas ao ambiente e já foram isoladas de coelhos e toupeiras, estão distribuídas no Extremo Oriente e em áreas onde a peste permanece endêmica. Não há evidências de que cause doença em humanos.

1.15. *Yersinia entomophaga*

A espécie *Y. entomophaga* foi descrita inicialmente por Hurst et al. (2011) a partir de um único micro-organismo isolado de uma larva de *Costelytra zealandica* na Nova Zelândia, baseados em características fenotípicas e no sequenciamento dos genes 16S rRNA, *dnaJ*, *glnA*, *gyrB*, *groEL* e *recA*.

1.16. *Yersinia pekkanenii*

Com base no sequenciamento dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA*, em estudos de hibridação DNA-DNA e nos padrões de restrição obtidos com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, Murros-Kontinen et al. (2011b) propuseram a criação da espécie *Y. pekkanenii*. As linhagens pertencentes a essa espécie não possuem os genes *inv* e *virF* e foram isoladas a partir de água, solo, alface o que sugere um habitat ambiental para essa espécie.

1.17. *Yersinia nurmii*

Com base no sequenciamento dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA*, em estudos de hibridação DNA-DNA e nos padrões de restrição obtidos com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, Murros-Konttiainen et al. (2011a) propuseram a criação da espécie *Y. nurmii*. As linhagens pertencentes a essa espécie não possuem os marcadores de virulência *inv*, *ail*, *yadA* e *virF* e foram isoladas a partir de pacotes carne de frango, embalados sob atmosfera modificada.

1.18. Tipagem molecular de *Yersinia* spp.

Os tradicionais métodos de tipagem bacteriana são baseados em características fenotípicas, como sorotipo, biotipo, fagotipo e susceptibilidade a antimicrobianos, entre outras. Entretanto, esses métodos são, frequentemente, limitados por sua baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de uma determinada espécie (OLIVE; BEAN, 1999).

De maneira contínua, a habilidade das metodologias de tipagem molecular em discriminar linhagens de uma mesma espécie tem aumentado e com isso tem crescido também a compreensão a respeito da transmissão, patogênese e filogenia de muitas espécies bacterianas (FOXMAN et al., 2005).

Cada vez mais, os métodos genotípicos têm sido utilizados na identificação, caracterização e em estudos epidemiológicos e taxonômicos bacterianos. Os métodos moleculares de tipagem bacteriana estão complementando os métodos convencionais baseados em características fenotípicas e auxiliando na compreensão da estrutura genômica de diferentes patógenos. Entretanto, nenhum deles pode ser considerado ideal para todas as linhas de investigação (COOPER; FEIL, 2004).

Vários métodos moleculares têm sido utilizados em estudos epidemiológicos, taxonômicos, filogenéticos e de estrutura populacional de bactérias do gênero *Yersinia*. As metodologias de *enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *repetitive extragenic palindrome* PCR (REP-PCR), ribotipagem, eletroforese em campo pulsado

(PFGE), sequenciamento do gene 16S rRNA e *multilocus sequence typing* (MLST) vêm sendo utilizadas com sucesso para tais finalidades (ACHTMAN et al., 1999; CH'NG et al., 2011; FALCÃO et al., 2006; GUIYOULE et al., 1997; ITEMAN; GUIYOULE; CARNIEL, 1996; KIM et al., 2003; KOTETISHVILI et al., 2005; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2011; SOUZA et al., 2010; WOJCIECH et al., 2004).

Apesar de algumas dessas técnicas terem poder discriminatório e reprodutibilidade altos, o seu custo e tempo de execução ainda limitam sua aplicabilidade para muitos estudos de genotipagem que necessitam de resultados rápidos a custos mais acessíveis (FOXMAN et al., 2005). Assim, encontrar uma técnica filogenética simples, eficiente, com aceitável poder discriminatório, relativamente barata, reprodutível e automatizada é de grande importância para análises em grande escala de micro-organismos.

1.19. Genotipagem bacteriana baseada em *high-resolution melting analysis*

A necessidade de uma técnica de genotipagem com etapas simples, de alta precisão e que possa ser realizada a custos razoáveis tem levado os pesquisadores a focarem-se em técnicas baseadas na detecção de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) para a tipagem molecular de micro-organismos. Os SNPs são mutações pontuais numa determinada sequência de DNA e apresentam como vantagens para a caracterização bacteriana a sua natureza sem ambiguidade e o grande número de plataformas que têm sido desenvolvidas para analisar tais marcadores (HOMMAIS et al., 2005; SCOTT et al., 2007). Ademais, os SNPs representam o tipo de variação de sequências de DNA mais encontrado no genoma. Estima-se que seja encontrado 1 SNP a cada 200-500 bases em regiões não-codificantes do DNA e, aproximadamente, 1 SNP a cada 500-1000 bases em regiões codificantes (BRUMFIELD et al., 2003; MORIN et al., 2004).

Por todos esses fatores, a tipagem bacteriana através da diferenciação de SNPs pode ser considerada uma técnica promissora para o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes linhagens.

Dentre as diversas plataformas disponíveis para a detecção de SNPs, a técnica de *high-resolution melting analysis* (HRMA) é o mais novo método para a detecção desse tipo de polimorfismo genético (LIEW et al., 2004; WU et al., 2008) e já foi utilizada com sucesso para identificação rápida de bactérias de origem clínica (CHENG et al., 2006; HARDICK et al., 2012; JENG et al., 2012) e de micobactérias não tuberculosas (PERNG et al., 2012), bem como para a identificação de *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina (AJITKUMAR; BARKEMA; DE BUCK, 2012; AJITKUMAR et al., 2013) e diferenciação de espécies de *Staphylococcus* (SLANY et al., 2010). HRMA também já foi utilizado com sucesso para a genotipagem de *Bacillus anthracis* (FORTINI et al., 2007), *Mycoplasma synoviae* (JEFFERY et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (STEPHENS et al., 2008), *Streptococcus pyogenes* (RICHARDSON et al., 2011), *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (LÉVESQUE et al., 2011; MERCHANT-PATEL et al., 2010), *Candida* spp. (ARANCIA et al., 2011), *Y. pestis* (CIAMMARUCONI et al., 2009), *Y. pseudotuberculosis* (SOUZA; FALCÃO, 2012a), *Pseudomonas savastanoi* (GORI; CERBONESCHI; TEGLI, 2012) e *Geobacillus* spp. (SEALE et al., 2012) e também para a detecção de resistência a antibióticos em *Mycobacterium tuberculosis* (CHOI et al., 2010; ONG et al., 2010; WANG et al., 2011), *Mycoplasma genitalium* (TWIN et al., 2012) e *Salmonella* Typhi e Paratyphi (SLINGER et al., 2007).

HRMA foi introduzido em 2002 por meio de uma colaboração entre pesquisadores e indústria e pode ser considerado o mais simples método para genotipagem e determinação de mutações e baseia-se no monitoramento da fluorescência de um agente intercalante de DNA dupla-fita (dsDNA), denominado *dye*, em função do aumento da temperatura (HOFINGER et al., 2009; REED; KENT; WITTEWER, 2007).

O desenvolvimento da técnica de HRMA esteve ligado diretamente a dois fatores primordiais. O primeiro deles foi o desenvolvimento de uma nova química de reação advinda do surgimento de novos agentes intercalantes de DNA, chamados agentes saturantes. Diferentemente

dos agentes intercalantes de DNA chamados não-saturantes, como SYBR Green I, os agentes saturantes podem ser adicionados em alta concentração à reação de polimerase em cadeia (PCR) sem inibi-la, garantindo dessa maneira uma completa intercalação ao *amplicon* gerado. Durante a fase de desnaturação do *amplicon*, os agentes não saturantes redistribuem-se na molécula o que não gera uma discriminação confiável entre diferenças de bases entre *amplicons*. Por outro lado, os agentes saturantes não são capazes de redistribuir-se no *amplicon* gerado, pois este está totalmente saturado (Figura 1). Dessa maneira, uma análise mais precisa do comportamento de *melting* do *amplicon* é possível (REED; KENT; WITTWER, 2007).

Figura 1. Agentes intercalantes de DNA saturantes e não saturantes (KAPABIOSYSTEMS, 2012).

O outro fator essencial para o desenvolvimento da técnica de HRMA foi o surgimento de instrumentos que coletam dados de fluorescência numa resolução de temperatura mais fina quando comparados aos equipamentos de *low-resolution melting* e também o desenvolvimento de *softwares* que utilizam novos algoritmos para interpretação dos dados de fluorescência gerados. Quando comparados aos instrumentos de coleta de fluorescência anteriores que possuem, geralmente, uma taxa de aumento de temperatura durante a etapa de *melting* de 0,5°C, os equipamentos de HRMA reduzem esse valor para incrementos sucessivos de 0,008 a 0,2°C (REED; KENT; WITTWER, 2007).

O curso de uma desnaturação térmica de uma molécula de dsDNA depende basicamente do seu tamanho e sequência. Pelo fato das duas fitas de DNA estarem ligadas por meio de ligações de hidrogênio estabelecidas entre os pares de bases nitrogenadas, quanto maior for a molécula maior será a energia térmica necessária para sua separação. Ademais, os pares guanina-citosina estabelecem três ligações de hidrogênio, enquanto os pares adenina-timina somente duas. Dessa maneira, quanto maior o conteúdo de guanina e citosina presentes em uma molécula, mais energia também será necessária para sua desnaturação (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

Uma análise de fluorescência de desnaturação de dsDNA, como é o caso do HRMA, inicia-se com uma reação de amplificação da região de interesse na presença de um agente intercalante saturante de dsDNA. O *dye* possui alta fluorescência quando ligado às moléculas de DNA e baixa fluorescência quando não ligado. A amplificação é seguida pela etapa de desnaturação térmica do produto da PCR. Nesse momento, as moléculas do agente intercalante de DNA são liberadas levando a mudanças na fluorescência. O resultado é um perfil de *melting* característico de cada *amplicon* (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

A redução na fluorescência começa lentamente, mas quando o dsDNA é desnaturado uma forte redução na fluorescência é detectada. A taxa de redução na fluorescência é

geralmente maior próximo à temperatura de *melting* (T_m) do produto de PCR (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

O processo de desnaturação pode ser simplesmente caracterizado pela temperatura de *melting* característica do *amplicon* que é definida como a temperatura na qual metade das moléculas de dsDNA inicialmente presentes encontram-se totalmente desnaturadas em moléculas de DNA de fita-simples (ssDNA) (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

Figura 2. Dados de fluorescência mostrando uma redução linear da fluorescência a baixas temperaturas seguida por uma rápida redução ao redor da temperatura de *melting* característica do *amplicon* (REED; KENT; WITTWER, 2007).

Como o *dye* é adicionado à PCR antes da amplificação, o processamento da amostra entre a amplificação e a análise não se faz necessário, o que reduz os riscos de contaminação e a necessidade de automação (REED; KENT; WITTWER, 2007; REED; WITTWER, 2004).

Outras vantagens relacionadas ao HRMA são derivadas da simplicidade da técnica. O único reagente necessário é o *dye*, que, geralmente, custa menos que os reagentes comumente

utilizados em reações de PCR. Como vantagens adicionais pode-se incluir o pouco tempo necessário para realização da técnica e a possibilidade de se realizar tanto a genotipagem quanto a determinação de mutações em uma única plataforma com a utilização de um reagente genérico para essa metodologia (LIEW et al., 2004; MERCHANT-PATEL et al., 2010; REED; KENT; WITTWER, 2007). Hung et al. (2008) reportaram um custo estimado para uma reação de genotipagem de SNP por HRMA de, aproximadamente, U\$1,50 por amostra.

Em alguns casos em particular, a resolução obtida em um ensaio de HRMA pode não ser suficiente para discriminar entre alterações de bases nitrogenadas. Esses casos ocorrem nas substituições de citosina por guanina e, especialmente nas substituições de adenina por timina (TAYLOR, 2009). Nesses casos é necessária a construção de heteroduplex formados pela adição de uma amostra de DNA cujo SNPs na região analisada seja conhecido. Essa adição de um DNA exógeno conhecido gerará na etapa de *melting* uma mistura de diferentes perfis de *melting* combinados em uma única curva de *melting* de saída, característico de uma amostra “heterozigota”. Os heteroduplex construídos desnaturam-se a temperaturas abaixo das temperaturas de desnaturação dos respectivos homoduplex e a curva de *melting* combinada possui uma forma distinta da forma da curva de *melting* encontrada em amostras “homozigotas” (GRAHAM et al., 2005; MONTGOMERY et al., 2007).

Figura 3. Análise de *melting* de um DNA heterozigoto (ZENG et al., 2012).

A Tabela 8 traz a classificação dos SNPs existentes, bem como as mudanças de base de cada classe e a mudança típica de temperatura encontrada com a alteração de base nitrogenada (LIEW et al., 2004).

Tabela 8. Classe de SNPs e mudança típica na temperatura de *melting* encontrada entre duas populações com mutações pontuais em uma determinada sequência

Classe de SNPs	Mudança de base encontrada ^a	Mudança típica na T _m
1	C/T e G/A	Grande (> 0,5°C)
2	C/A e G/T	Grande (> 0,5°C)
3	C/G	Pequena (0,2-0,5°C)
4	A/T	Muito pequena (< 0,2°C)

^a, A – citosina; T – timina; C – citosina; G – guanina

Alguns métodos para determinação de mutações pontuais diferentes da técnica de HRMA foram desenvolvidos para a determinação de diferenças no DNA de indivíduos (OCTAVIA; LAN, 2007). Muitos deles realizam a genotipagem e a determinação de

mutações ao mesmo tempo, mas requerem grande automação, aparelhagem e análise. Todos esses métodos necessitam da separação das amostras em um gel ou outra matriz e alguns deles necessitam também de processamento enzimático ou químico. Qualquer tipo de processamento da amostra aumenta os custos e também os riscos de contaminação, pois os produtos de PCR são expostos ao meio ambiente. Além disso, alguns desses métodos são manuais e trabalhosos, enquanto outros são complexos e necessitam instrumentação especializada (ERALI; VOELKERDING; WITTWER, 2008; LIEW et al., 2004; REED; KENT; WITTWER, 2007).

De todas as técnicas disponíveis para tipagem molecular de micro-organismos, HRMA é o único método em que a genotipagem e a determinação de mutações podem ser realizadas no mesmo recipiente utilizado para amplificação. A análise de perfis de mutações pode ser realizada em aproximadamente dois minutos o que, aliado ao baixo custo característico da técnica pode reduzir a quantidade necessária de sequenciamento e aumentar potencialmente o número de amostras analisadas (CHO et al., 2008; REED; WITTWER, 2004).

Os dados produzidos por HRMA são portáteis e, por essa razão, não somente viáveis para comparação entre genótipos, mas também para a construção de bancos de dados. Esse aspecto pode facilitar uma tentativa de colaboração internacional baseada na utilização de métodos de genotipagem baseados em SNP visando aumentar os estudos de genética e biodiversidade de populações (STEPHENS et al., 2008).

Diante de todo o exposto, o HRMA pode ser considerado uma alternativa simples, confiável, barata e rápida para estudos de genotipagem e determinação de mutações em pequenos laboratórios (GARRITANO et al., 2009; REED; KENT; WITTWER, 2007; SMITH; LU; ALVARADO BREMER, 2010; SMITH; LU; ALVARADO BREMER, 2013; WU et al., 2008).

2. Relevância do estudo

“Raros são aqueles que decidem após madura reflexão;
os outros andam ao sabor das ondas e, longe de se conduzirem,
deixam-se levar pelos primeiros”
(Sêneca)

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Considerando-se a incidência, a patogenicidade e a disseminação das espécies de *Yersinia* spp., torna-se importante ampliar os estudos moleculares e epidemiológicos sobre esse gênero.

Vários métodos moleculares tais como ERIC-PCR, REP-PCR, ribotipagem, PFGE, sequenciamento do gene 16S rRNA e MLST, entre outros, têm sido utilizados com sucesso nos estudos epidemiológicos, taxonômicos, filogenéticos e de estrutura populacional de bactérias do gênero *Yersinia* (ACHTMAN et al., 1999; CH'NG et al., 2011; FALCÃO et al., 2006; GUIYOULE et al., 1997; ITEMAN; GUIYOULE; CARNIEL, 1996; KIM et al., 2003; KOTETISHVILI et al., 2005; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2011; SOUZA et al., 2010; WOJCIECH et al., 2004). Entretanto, o custo e tempo de execução de algumas dessas técnicas ainda limitam sua aplicabilidade para muitos estudos de genotipagem que necessitam de resultados rápidos a custos mais acessíveis (FOXMAN et al., 2005).

A técnica de HRMA por ser considerada uma técnica simples e de baixo custo para a tipagem molecular de linhagens bacterianas pode ser utilizada como uma alternativa aos métodos moleculares frequentemente utilizados nos estudos epidemiológicos e filogenéticos das diversas espécies pertencentes ao gênero *Yersinia*.

Dessa maneira, o desenvolvimento de um método de genotipagem de *Yersinia* spp. baseado em HRMA deverá ampliar as possibilidades de ferramentas moleculares que contribuam para a caracterização filogenética e epidemiológica do gênero *Yersinia* através da utilização de uma plataforma simples, barata, rápida e possível de ser realizada para um grande número de amostras. Devido a essa característica de *high-throughput assay*, o HRMA poderá delinear mais detalhadamente características epidemiológicas das diversas espécies pertencentes a esse gênero bacteriano.

3. Objetivos

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem”

(João Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas)

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

- 3.1.1. Genotipar linhagens de *Yersinia* spp. por *high-resolution melting analysis* (HRMA)

3.2.Objetivos específicos

- 3.2.1. Desenvolver um método de genotipagem de *Yersinia* spp. baseado em HRMA para a diferenciação de SNPs presentes nas sequências dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* nas espécies *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei*
- 3.2.2. Aplicar a técnica de HRMA otimizada para a genotipagem de 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis*
- 3.2.3. Aplicar a técnica de HRMA otimizada para a genotipagem de 50 linhagens de *Y. enterocolitica*
- 3.2.4. Diferenciar *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA

4. Material e Métodos

“A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais”
(Aristóteles)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Yersinia* spp., foram utilizadas 55 linhagens de diferentes espécies. Dessas, 53 linhagens de *Yersinia* spp. foram selecionadas a partir da coleção de cultura do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*. Também foram utilizadas duas linhagens de *Y. pestis* cujos DNAs foram fornecidos pelo Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) de Recife-PE.

A Tabela 9 traz de forma mais detalhada as características das 55 linhagens de *Yersinia* spp. que foram utilizadas para a detecção de SNPs nas diferentes espécies do gênero.

Tabela 9 – Características e procedência das 55 linhagens de *Yersinia* spp. utilizadas para a detecção de SNPs

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local
<i>Y. bercovieri</i> ATCC 43970 ^T	Humana	Fezes	O:58,73	França
<i>Y. bercovieri</i> WE 582/87	Humana	---	O:70,36	Bélgica
<i>Y. bercovieri</i> IP 7966	Ambiente	Solo	O:69	França
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610 ^T	Humana	Infecção de face	1B/O:8	Est. Unidos
<i>Y. enterocolitica</i> 8081	Humana	---	1B/O:8	Est. Unidos
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 108	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 352	Humana	Mãos	3/O:5,27	Brasil
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 505	Alimento	Carne	1A/O:5,27	Brasil
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7887	Animal	Fezes de porco	4/O:3	Brasil
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8239	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
<i>Y. frederiksenii</i> ATCC 33641 ^T	Ambiente	Esgoto	---	Dinamarca
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 236	Alimento	Leite	O:40	Brasil
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 379	Animal	Fezes diarreicas	O:16	Brasil
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 412	Alimento	Linguiça	O:40	Brasil
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 543	Humana	Fezes diarreicas	O:74	Brasil

Continua

Continuação

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 577	Humana	Fezes diarreicas	O:16,58	Brasil
<i>Y. intermedia</i> ATCC 29909 ^T	Humana	Urina	1/O:17	França
<i>Y. intermedia</i> FCF 297	Alimento	Carne	6/O:17	Brasil
<i>Y. intermedia</i> FCF 323	Ambiente	Água de rio poluído	4/O:40	Brasil
<i>Y. intermedia</i> FCF 349	Ambiente	Água de lagoa	1/O:4,33	Brasil
<i>Y. intermedia</i> IP 8181	Humana	Fezes diarreicas	1/NAG ⁽¹⁾	Brasil
<i>Y. intermedia</i> IP 8184	Animal	Fezes diarreicas	1/O:17	Brasil
<i>Y. intermedia</i> IP 8373	Alimento	Leite	1/O:7,8	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> ATCC 33638 ^T	Humana	Urina	O:11	Dinamarca
<i>Y. kristensenii</i> FCF 61	Alimento	Leite cru	O:9	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> FCF 281	Alimento	Carne	O:11,24	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> FCF 326	Ambiente	Água de rio poluído	O:11,24	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> FCF 410	Alimento	Linguiça fresca	O:11	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> FCF 580	Alimento	Ostra	O:61	Brasil
<i>Y. kristensenii</i> FCF 604	Animal	Fezes de capivara	NAG ⁽¹⁾	Brasil
<i>Y. massiliensis</i> CCUG 53443 ^T	Ambiente	Água de diálise	---	França
<i>Y. massiliensis</i> FCF 216	Ambiente	Água de nascente	O:10	Brasil
<i>Y. massiliensis</i> FCF 457	Alimento	Leite pasteurizado	O:22	Brasil
<i>Y. massiliensis</i> FCF 465	Ambiente	Água natural	O:10,34	Argentina
<i>Y. massiliensis</i> FCF 494	Alimento	Alface	O:10,34	Brasil
<i>Y. mollaretii</i> ATCC 43969 ^T	Ambiente	Solo	O:7,36	Est. Unidos
<i>Y. mollaretii</i> WE 316/84	Humana	Fezes	O:68	Bélgica
<i>Y. mollaretii</i> WA 751	Ambiente	Água potável	O:59	Alemanha
<i>Y. mollaretii</i> WE 19/88	---	---	O:75	---
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833 ^T	---	---	1/O:1	Turquia
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp5	Animal	Fezes diarreicas de bovino	2/O:3	Brasil
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp22	Animal	Fezes diarreicas de bovino	2/O:3	Brasil
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp30	Animal	Gânglio mesentérico de bubalino	1/O:1	Brasil
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp31	Animal	Gânglio mesentérico de bubalino	1/O:1	Brasil
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp43	Animal	Fezes diarreicas de bovino	2/ O:3	Brasil
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp104	Animal	Fezes normais de bubalino	2/O:3	Brasil

Continua

Conclusão

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local
<i>Y. rohdei</i> ATCC 43380 ^T	Animal	Fezes de cachorro	1/O:38	Alemanha
<i>Y. rohdei</i> WA 9/90	---	---	1/O:76	Alemanha
<i>Y. rohdei</i> FCF 466	Ambiente	Água potável	1/O:38	Argentina
<i>Y. rohdei</i> IP 8400	Ambiente	Água de rio	1/NAG ⁽¹⁾	Chile
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473 ^T	Animal	Peixe com DBV ⁽²⁾	O:1a	Est. Unidos
<i>Y. ruckeri</i> FCF 229	Alimento	Carne moída	O:25	Brasil
<i>Y. ruckeri</i> FCF 231	Alimento	Carne moída	O:25	Brasil
<i>Y. pestis</i> P.EXU 817	Animal	Roedor	Orientalis	Brasil
<i>Y. pestis</i> P.PB 867	Animal	Roedor	Orientalis	Brasil

^T, linhagem “tipo” da espécie; ⁽¹⁾, NAG: não aglutinável; ⁽²⁾, DBV: doença da boca vermelha

Para a genotipagem de linhagens de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA, foram utilizadas 40 linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* isoladas no Brasil e selecionadas a partir da coleção de cultura do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*. A Tabela 10 traz de forma mais detalhada as características das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* que foram genotipadas pela técnica de HRMA.

Tabela 10 - Características e procedência das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local de isolamento
Yp1	Bubalino doente	Órgãos	2/O:3	Curitiba/PR
Yp2	Bovino doente	Alça intestinal	2/O:3	Curitiba/PR
Yp4	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp8	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Londrina/PR
Yp10	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp14	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp15	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp21	Suíno doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Londrina/PR
Yp22	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Londrina/PR

Continua

Conclusão

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local de isolamento
Yp26	Bovino doente	Intestino delgado	2/O:3	Curitiba/PR
Yp28	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp30	Bubalino doente	Gânglio mesentérico	1/O:1	Pelotas/RS
Yp31	Bubalino doente	Gânglio mesentérico	1/O:1	Pelotas/RS
Yp32	Bubalino doente	Gânglio mesentérico	1/O:1	Pelotas/RS
Yp34	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp35	Bovino doente	Intestino delgado	2/O:3	Curitiba/PR
Yp37	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp40	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp43	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp45	Bovino doente	Intestino delgado	2/O:3	Curitiba/PR
Yp46	Bovino doente	Intestino grosso	2/O:3	Curitiba/PR
Yp52	Bovino doente	Intestino grosso	2/O:3	Curitiba/PR
Yp57	Bovino doente	Intestino delgado	2/O:3	Curitiba/PR
Yp61	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp67	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp70	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp71	Bovino doente	Intestino delgado	2/O:3	Curitiba/PR
Yp75	Bovino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Curitiba/PR
Yp78	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp80	Bubalino doente	Fezes diarreicas	2/O:3	Pelotas/RS
Yp84	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp85	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp90	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp94	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp95	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp99	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp100	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp101	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp104	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS
Yp105	Bubalino sadio	Fezes normais	2/O:3	Pelotas/RS

Para a genotipagem de linhagens de *Y. enterocolitica* por HRMA, foram utilizadas 50 linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* selecionadas a partir da coleção de cultura do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*. A Tabela 11 traz de forma mais detalhada as características das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* que foram genotipadas pela técnica de HRMA.

Tabela 11 - Características e procedência das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local de isolamento
FCF 125	Ambiente	Água	1A/O:27	Brasil
FCF 153	Ambiente	Água	1A/O:27	Brasil
FCF 195	Alimento	Leite pasteurizado	1A/O:6,31	Brasil
FCF 387	Humana	Fezes normais	1A/O:5	Brasil
FCF 483	Alimento	Leite cru	1A/O:41,42	Brasil
FCF 505	Alimento	Carne	1A/O:5,27	Brasil
FCF 571	Alimento	Ostra	1A/O:7,8	Brasil
FCF 587	Alimento	Almôndegas	1A/O:41,42	Brasil
FCF 610	Humana	Fezes diarreicas	1A/O:8,19	Brasil
IP 6883	Animal	Rato selvagem	1A/O:7,8	Chile
IP 7326	Humana	Fezes diarreicas	1A/O:7,8	Chile
IP 8395	Animal	Roedor	1A/O:4,32	Chile
IP 8396	Animal	Boi	1A/O:7,8	Chile
ATCC 9610 ^T	Humana	Infecção de face	1B/O:8	Est. Unidos
8081	Humana	---	1B/O:8	Est. Unidos
FCF 197	Alimento	Leite	1B/O:7,8	Brasil
FCF 474	Humana	Fezes diarreicas	1B/O:20	Colômbia
FCF 106	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 107	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 108	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 112	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil

Continua

Conclusão

Linhagens	Origem	Material	Bio-sorogrupo	Local de isolamento
FCF 116	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 127	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 142	Ambiente	Água	2/O:5,27	Brasil
FCF 602	Animal	Fezes de capivara	2/O:3	Brasil
IP 7661	Humana	Fezes diarreicas	2/O:5	Brasil
IP 7662	Humana	Fezes diarreicas	2/O:5	Brasil
IP 7663	Humana	Fezes diarreicas	2/O:5	Brasil
IP 7664	Humana	Fezes diarreicas	2/O:5	Brasil
IP 7665	Humana	Fezes diarreicas	2/O:5	Brasil
FCF 123	Ambiente	Água	3/O:5,27	Brasil
FCF 327	Ambiente	Água do mar	3/O:5,27	Brasil
FCF 329	Ambiente	Água do mar	3/O:5,27	Brasil
FCF 331	Ambiente	Água do mar	3/O:5,27	Brasil
FCF 352	Humana	Mãos	3/O:5,27	Brasil
CCUG 8233	Humana	Fezes	4/O:3	Suécia
FCF 76	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
FCF 78	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
FCF 374	Animal	Fezes de suíno	4/O:3	Brasil
FCF 380	Animal	Fezes de suíno	4/O:3	Brasil
FCF 384	Animal	Fezes de cachorro	4/O:3	Brasil
FCF 472	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
FCF 600	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
FCF 615	Humana	Sangue	4/O:3	Brasil
FCF 626	Humana	Sangue	4/O:3	Brasil
IP 3890	Animal	Abscesso de fígado	4/O:3	Brasil
IP 7887	Animal	Fezes de suíno	4/O:3	Brasil
IP 8016	Animal	Fígado de macaco	4/O:3	Brasil
IP 8239	Humana	Fezes diarreicas	4/O:3	Brasil
CCUG 8232	Animal	Lebre	5/O:1,2,3	Suécia

4.2.Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica

A verificação da pureza e a reconfirmação bioquímica foram realizadas para todas as linhagens de *Yersinia* spp. listadas nas Tabelas 9, 10 e 11 com exceção das duas linhagens de *Y. pestis*.

Para a verificação da pureza, cada uma das linhagens de *Yersinia* foi semeada em meio líquido BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (Oxoid) a 28°C por 24 horas. Para o isolamento, foram retiradas alíquotas do caldo BHI e semeadas pelo método de esgotamento em ágar MacConkey (Himedia) seguido de incubação a 28°C por 24 horas. Em seguida, colônias isoladas foram semeadas em ágar TSI (do inglês, *Triple Sugar Iron*) (Himedia), EPM (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982a), MILi (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982b) e Citrato de Simmons (Difco).

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

4.3.Reconfirmação dos biotipos

Fez-se a reconfirmação dos biotipos para as espécies de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei*, conforme descrito por Fredriksson-Ahomaa (2007), Schriefer; Petersen (2011), Martin et al. (2009) e Aleksic et al. (1987), respectivamente.

4.4.Reconfirmação sorológica

As linhagens pertencentes às espécies *Y. enterocolitica*, *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* e *Y. massiliensis* foram sorotipadas de acordo com Wauters et al. (1991) e as linhagens de *Y. pseudotuberculosis* foram sorotipadas de acordo Tsubokura e Aleksic (1995). A sorotipagem foi feita utilizando-

se o crescimento das culturas bacterianas incubadas a 25°C por 24 horas e anti-soros somáticos obtidos de coelhos.

4.5.Armazenamento das linhagens bacterianas

Após o isolamento, identificação e realização das provas para a reconfirmação bioquímica, as linhagens de *Yersinia* spp. listadas nas Tabelas 9, 10 e 11, com exceção das duas linhagens de *Y. pestis* foram semeadas para estocagem em tubos contendo 3 mL do meio de cultura BHI (Oxoid). Após incubação de 24 horas à temperatura de 28°C, 1.430 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 (Oxoid), incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas e em seguida semeadas em ágar MacConkey (Himedia) pelo método de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Após 24 horas à 28°C as colônias isoladas foram submetidas aos experimentos subsequentes.

4.6.Extração do DNA genômico

Todas as linhagens de *Yersinia* spp. listadas nas Tabelas 9, 10 e 11, com exceção das duas linhagens de *Y. pestis* tiveram o DNA genômico extraído segundo o protocolo descrito por Falcão et al. (2006).

Brevemente, as linhagens foram inoculadas em 4,0 mL de meio BHI e incubadas a 28°C por 24 horas. Em seguida, 3,0 mL de meio BHI foram sedimentadas por centrifugação (2300 g/3 minutos) em centrífuga 5810 R (*Eppendorf*) e o sedimento suspenso em 250 µL de solução I (20% de sacarose, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 50 mM) a 4°C. Após 10 minutos em gelo, as células foram lisadas com 500 µL de solução II (NaCl 50 mM , 1% de

sarcosil e 0,05 mg/mL de proteinase K) por 2 horas a 37°C. Subsequentemente, as linhagens bacterianas foram submetidas à purificação do DNA genômico com 750 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugadas (2300 g/10 minutos) em centrífuga 5810 R (*Eppendorf*). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a ele foi adicionado 750 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), em seguida centrifugado (2300 g/10 minutos) em centrífuga 5810 R (*Eppendorf*). O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a ele foi adicionado 1,0 mL de etanol a 4°C e incubado em gelo por 15 minutos. Em seguida, o DNA foi sedimentado por centrifugação (4°C/2300 g/30 minutos) em centrífuga 5810 R (*Eppendorf*). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em concentrador de amostra 5301 (*Eppendorf*) e, posteriormente, suspenso em 400 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (*Life Technologies*). Aos 400 µL de suspensão de DNA foram adicionados 2,0 µL de RNase (50 µg/mL) e incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas.

A integridade do DNA extraído foi avaliada em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. A 5,0 µL do DNA extraído foram adicionados 2 µL de solução de azul de bromofenol (40% de sacarose; 0,25% de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.). A eletroforese foi conduzida a 80 Volts por 2 horas. Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, e observados em transluminador ultravioleta Gel Doc XR (*Bio-Rad Laboratories*) e registrados em *software* fotográfico Quantity One versão 4.6.1 (*Bio-Rad Laboratories*).

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada usando o equipamento Nanodrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*), e sua pureza estimada conforme descrito por Sambrook; Russel (2001). Foram consideradas como boas as extrações de pureza

entre 1,75 e 2,0 (A_{260nm}/A_{280nm}). Para amostras acima ou abaixo desses valores uma nossa extração de DNA foi realizada.

4.7. Identificação dos SNPs nas diferentes espécies de *Yersinia* estudadas

Para a identificação dos SNPs presentes nas diferentes espécies de *Yersinia* foram selecionados cinco *loci*, previamente descritos Kotetishvili et al. (2005). Inicialmente, fragmentos internos dos *loci* 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* das 55 linhagens de *Yersinia* spp. listadas na Tabela 9 foram sequenciados utilizando-se os pares de *primers* descritos por Kotetishvili et al. (2005) e o protocolo descrito por Souza et al. (2010).

A Tabela 12 traz as sequências dos *primers*, tamanho dos fragmentos obtidos e as temperaturas de hibridação características dos pares de *primers* utilizados para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA*.

Tabela 12. Dados gerais sobre os *primers* e temperaturas de hibridação utilizados para os cinco genes sequenciados (KOTETISHVILI et al., 2005)

Genes	Sequência dos “primers” (5’→3’)	Amplicon (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
16S rRNA	AGT TTG ATC ATG GCT CAG TTA CCG CGG CTG CTG GCA	500	52
<i>glnA</i>	CGA TTG GTG GCT GGA AAG GC TTG GTC ATR GTR TTG AAG CG	530	55
<i>gyrB</i>	CGG CGG TTT GCA YGG YGT RGG CAG SGT RCG RGT CAT YGC CG	545	69
<i>recA</i>	GGG CCA AAT TGA AAA RCA RTT CGG CGC CRA TYT TCA TRC GRA TYT GGT	560	66
<i>hsp60</i>	GAC GTN GTA GAA GGT ATG YAG CGC CGC CAG CCA GTT TAG C	565	64

A Tabela 13 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a realização da amplificação dos genes para sequenciamento.

Tabela 13. Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* para sequenciamento (SOUZA et al., 2010)

Componentes	Volume (µL)
10X Tampão “PCR Buffer” ^a	5
10 mM “dNTP mixture” ^a	1
Primer forward (10 pmol/µL) ^a	2,5
Primer reverse (10 pmol/µL) ^a	2,5
50 mM de MgSO ₄ ^a	2
DNA genômico (10 ng/µL)	5
Taq DNA Polimerase “High Fidelity” (1U/µL) ^a	1
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50

^a Produto *Life Technologies*

Reações sem DNA foram usadas como controle negativo. O termociclador utilizado para amplificação dos genes para sequenciamento foi o *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (*Bio-Rad Laboratories*).

As condições de amplificação foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA - 94°C por 45 segundos.
- Hibridação - X°C por 45 segundos (X – Temperatura de hibridação)
- Extensão - 72°C por 1 minuto.

Após os 35 ciclos de amplificação, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

O produto amplificado foi visualizado por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (*Life Technologies*). A eletroforese foi conduzida a

80 Volts por 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, visualizados em transluminador de luz U.V. *Gel Doc XR* (Bio-Rad Laboratories) e registrados com o *software* fotográfico *Quantity One* versão 4.6.1, (Bio-Rad Laboratories).

Após a amplificação e verificação dos produtos amplificados, os produtos de PCR foram purificados, utilizando o *kit* de purificação *DNA GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare), segundo recomendações do fabricante e submetidos à reação de sequenciamento, conforme o protocolo descrito por Souza et al. (2010).

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, situado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em sequenciador automático de DNA *MegaBace™ 1000 DNA Sequencing System* (GE HealthCare).

Para a realização dos sequenciamentos, 1 µL de cada produto de PCR e 0,8 µL de *primer forward* ou *primer reverse* a 10 pmol/µL foram adicionados a 4 µL de solução do *kit* *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE HealthCare) e água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (*Life Technologies*) suficiente para o volume final de 10,5 µL em microplaca de 96 poços. Em seguida, a placa foi colocada no termociclador *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories), programado para executar os seguintes ciclos: 95°C por 2 segundos, 95°C por 10 segundos, 51°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As três últimas etapas foram repetidas 35 vezes.

O DNA amplificado foi precipitado, seguindo-se o protocolo de precipitação sugerido pelo manual do *kit* de sequenciamento. Foram acrescidos 2 µL de acetato de amônio em cada poço da placa, e 50 µL de etanol absoluto em temperatura ambiente, e a reação homogeneizada energeticamente em agitador mecânico, seguido de repouso por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após o repouso, as placas foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos em centrífuga 5804R (*Eppendorf*) na velocidade de 3200 g. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi desprezado, e 200 µL de etanol 70% à temperatura ambiente foram acrescentados em cada poço. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e o DNA suspenso em agitador mecânico com 10 µL de “*loading buffer*”, fornecido com o *kit* de sequenciamento (*GE HealthCare*) e uma nova centrifugação de apenas alguns segundos foi realizada, para garantir que o material precipitasse no fundo dos poços. Finalmente, as amostras foram sequenciadas em *MegaBace™ 1000 DNA Sequencing System* (*GE HealthCare*), nas condições de 9 KV, durante 90 segundos com o tempo de corrida de 150 minutos. Os resultados foram documentados automaticamente em eletroferogramas de extensão *abd*.

Para cada gene foram realizadas pelo menos quatro reações de amplificação, duas em sentido *forward* e duas em sentido *reverse*, para garantir a reprodutibilidade e qualidade das sequências obtidas.

Após o sequenciamento e análise inicial da qualidade das sequências, cada conjunto de sequências de um mesmo gene de uma mesma linhagem foi analisado pelo programa *ChromasPro* versão 1.5 (*Technelysium Pty LTD*). Pela análise dos eletroferogramas foram gerados *contigs*, ou seja, várias sequências de um mesmo gene sobrepostas, a fim de obter-se uma sequência consenso para cada uma das linhagens sequenciadas. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank/EMBL/DDBJ.

Adicionalmente às sequências das 55 linhagens de *Yersinia* spp. (Tabela 9) anteriormente obtidas, também foram utilizadas sequências dos genes estudados de 64 linhagens de *Yersinia* spp. previamente depositadas no GenBank/EMBL/DDBJ para a identificação dos SNPs presentes nas diferentes espécies de *Yersinia*, totalizando 119 linhagens.

Os números de acesso no GenBank/EMBL/DDBJ de todas as sequências utilizadas para a identificação dos SNPs presentes nos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* em cada uma das espécies de *Yersinia* encontram-se descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Números de acesso no GenBank/EMBL/DDBJ das sequências de *Yersinia* spp. utilizadas para a identificação dos SNPs presentes nos *loci* estudados

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. bercovieri</i> ATCC 43970 ^T	FJ518720	FJ518732	FJ518744	FJ518756	FJ518768
<i>Y. bercovieri</i> WE 582/87	KC788288	KC788310	KC788332	KC788354	KC788376
<i>Y. bercovieri</i> IP 7966	KC788289	KC788311	KC788333	KC788355	KC788377
<i>Y. bercovieri</i> W 601	AY332805	-----	-----	-----	AY332962
<i>Y. bercovieri</i> WE 82/87	AY332808	AY333019	AY332913	AY332860	AY332965
<i>Y. bercovieri</i> WS 19/96	AY332914	AY333020	AY38093	AY332861	AY332966
<i>Y. bercovieri</i> WS 27/96	AY332810	AY333021	AY332915	AY332862	AY332967
<i>Y. bercovieri</i> WS 39/98	AY332811	AY333022	AY332916	AY332863	AY332968
<i>Y. bercovieri</i> WA 17/96	AY332806	AY333018	AY332911	AY332859	AY332963
<i>Y. bercovieri</i> WA 315	AY332807	-----	AY32912	-----	AY332964
<i>Y. bercovieri</i> 6519	AY332804	AY333016	-----	AY332857	-----
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610 ^T	KC788290	KC788312	KC788334	KC788356	KC788378
<i>Y. enterocolitica</i> 8081	FJ518725	FJ518737	FJ518749	FJ518761	FJ518773
<i>Y. enterocolitica</i> 30.42.67	-----	AY333023	-----	AY332864	-----
<i>Y. enterocolitica</i> YE 37	AY332814	AY333026	AY332919	AY332867	AY332972
<i>Y. enterocolitica</i> 1476	AY332815	AY333027	AY332920	-----	-----
<i>Y. enterocolitica</i> 7175	-----	-----	-----	-----	AY332973
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 108	FJ518721	FJ518733	FJ518745	FJ518757	FJ518769
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 352	FJ518722	FJ518734	FJ518746	FJ518758	FJ518770
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 505	FJ518723	FJ518735	FJ518747	FJ518759	FJ518771
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7887	KC788291	KC788313	KC788335	KC788357	KC788379
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8239	FJ518724	FJ518736	FJ518748	FJ518760	FJ58772
<i>Y. enterocolitica</i> A1074	AY332813	-----	-----	AY332866	AY332970

Continua

Continuação

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 7758	EF179127	-----	EF175581	EF173164	-----
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 8239A	EF179130	-----	EF175582	EF173165	-----
<i>Y. enterocolitica</i> W 22708	-----	AY333025	AY332918	-----	AY332971
<i>Y. enterocolitica</i> W 22708	-----	AY333025	AY332918	-----	AY332971
<i>Y. frederiksenii</i> ATCC 33641 ^T	AY332818	AY333029	AY332923	AY332869	AY332975
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 236	KC776772	KC776794	KC776816	KC776838	KC776860
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 379	KC776766	KC776788	KC776810	KC776832	KC776854
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 412	KC776773	KC776795	KC776817	KC776839	KC776861
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 543	KC776774	KC776796	KC776818	KC776840	KC776862
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 577	KC776759	KC776781	KC776803	KC776825	KC776847
<i>Y. frederiksenii</i> WA 933	AY332820	AY333031	AY332925	AY332871	AY332977
<i>Y. frederiksenii</i> WS 52/02	AY332923	AY333034	AY332928	AY332874	AY332979
<i>Y. frederiksenii</i> WA 935	AY332821	AY333032	AY332926	AY332872	AY332978
<i>Y. frederiksenii</i> WE 83/02	AY332822	AY333033	AY332927	AY332873	-----
<i>Y. frederiksenii</i> 7175	AY332816	-----	AY332921	-----	-----
<i>Y. frederiksenii</i> 867	AY332817	AY333028	AY332922	AY332868	AY332974
<i>Y. frederiksenii</i> CNY 867	AY332819	AY333030	AY332924	AY332870	AY332976
<i>Y. intermedia</i> ATCC 29909 ^T	AY332825	AY333036	AY332930	AY332876	AY332981
<i>Y. intermedia</i> FCF 297	KC788292	KC788314	KC788336	KC788358	KC788380
<i>Y. intermedia</i> FCF 323	KC788293	KC788315	KC788337	KC788359	KC788381
<i>Y. intermedia</i> FCF 349	KC788294	KC788316	KC788338	KC788360	KC788382
<i>Y. intermedia</i> IP 8181	KC788295	KC788317	KC788339	KC788361	KC788383
<i>Y. intermedia</i> IP 8184	KC788296	KC788318	KC788340	KC788362	KC788384
<i>Y. intermedia</i> IP 8173	KC788297	KC788319	KC788341	KC788363	KC788385
<i>Y. intermedia</i> 955	AY332824	AY333035	AY332929	AY332875	AY332980
<i>Y. intermedia</i> WE 24/02	AY332826	AY333038	AY332932	AY332878	AY332931
<i>Y. intermedia</i> WE 57/93	AY332827	AY333039	AY332933	AY332879	AY332984
<i>Y. intermedia</i> WS 11/01	AY332828	AY333040	AY332934	AY332880	AY332985
<i>Y. intermedia</i> WA 11/94	-----	AY333037	AY332931	AY332877	AY332982

Continua

Continuação

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. intermedia</i> WS 58/02	AY332829	AY333041	AY332935	AY332881	AY332986
<i>Y. kristensenii</i> ATCC 33638 ^T	AY332832	AY333044	AY332937	AY332883	AY332989
<i>Y. kristensenii</i> FCF 61	KC788298	KC788320	KC788342	KC788364	KC788386
<i>Y. kristensenii</i> FCF 281	KC788299	KC788321	KC788343	KC788365	KC788387
<i>Y. kristensenii</i> FCF 326	KC788300	KC788322	KC788344	KC788366	KC788388
<i>Y. kristensenii</i> FCF 410	KC788301	KC788323	KC788345	KC788367	KC788389
<i>Y. kristensenii</i> FCF 580	KC788302	KC788324	KC788346	KC788368	KC788390
<i>Y. kristensenii</i> FCF 604	KC788303	KC788325	KC788347	KC788369	KC788391
<i>Y. kristensenii</i> WA 948	-----	AY333045	AY332938	AY332884	AY332909
<i>Y. kristensenii</i> WE 414/93	AY332834	AY333047	AY332940	AY332886	AY332992
<i>Y. kristensenii</i> WE 45/98	AY332835	AY333048	AY332941	AY332887	AY332993
<i>Y. kristensenii</i> 105	AY332830	AY333042	AY332936	AY332882	AY332987
<i>Y. kristensenii</i> 490	AY332831	AY333043	-----	-----	AY332988
<i>Y. kristensenii</i> WE 180/98	AY332833	AY333046	AY332939	AY332885	AY332991
<i>Y. kristensenii</i> WS O52	AY332836	AY333049	AY332942	AY332888	AY332994
<i>Y. massiliensis</i> CCUG 53443 ^T	EF179119	FJ717356	EF175588	EF173174	FJ717390
<i>Y. massiliensis</i> CCUG 53444	EF179120	-----	EF175591	EF173177	-----
<i>Y. massiliensis</i> FCF 216	GQ421616	HM003824	GQ421620	GQ421624	HM003828
<i>Y. massiliensis</i> FCF 457	GQ421618	HM003826	GQ421622	GQ421626	HM003830
<i>Y. massiliensis</i> FCF 465	GQ421617	HM003825	GQ421621	GQ421625	HM003829
<i>Y. massiliensis</i> FCF 494	GQ421619	HM003827	GQ421623	GQ421627	HM003831
<i>Y. mollaretii</i> ATCC 43969 ^T	AY332837	AY333050	AY332943	AY332889	AY332995
<i>Y. mollaretii</i> WA 134/92	AY332838	AY333051	-----	AY332890	AY332996
<i>Y. mollaretii</i> WA 751	KC788304	KC788326	KC788348	KC788370	KC788392
<i>Y. mollaretii</i> WA 309	-----	AY333052	-----	-----	AY332997
<i>Y. mollaretii</i> WE 19/88	KC788305	KC788327	KC788349	KC788371	KC788393
<i>Y. mollaretii</i> WE 302/92	AY332840	AY333054	AY332945	-----	AY332999
<i>Y. mollaretii</i> WE 149/92	AY332839	AY333053	AY332944	AY332891	AY332998
<i>Y. mollaretii</i> WE 316/84	KC788306	KC788328	KC788350	KC788372	KC788394

Continua

Continuação

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. mollaretii</i> WS 44/98	AY332841	AY333056	AY332946	AY332893	AY333001
<i>Y. mollaretii</i> WS 43/94	-----	AY333055	-----	AY332892	AY333000
<i>Y. mollaretii</i> WS 61/99	AY332842	AY333057	AY332947	AY332894	AY333002
<i>Y. pestis</i> CO 92			NC_003143 ^a		
<i>Y. pestis</i> KIM			AE009952 ^a		
<i>Y. pestis</i> 91001			NC_005810 ^a		
<i>Y. pestis</i> P.EXU 817	FJ518727	FJ518739	FJ518751	FJ518763	FJ518775
<i>Y. pestis</i> P.PB 867	FJ518726	FJ518738	FJ518750	FJ518762	FJ518774
<i>Y. pestis</i> Z176003			CP001593 ^a		
<i>Y. pestis</i> 91001			NC_005810 ^a		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833 ^T	KC776733	KC776734	KC776735	KC776736	KC776737
<i>Y. pseudotuberculosis</i> CDC 801-84	AY332854	AY333069	AY332959	AY332906	AY333013
<i>Y. pseudotuberculosis</i> CDC 542-84	AY332853	AY333068	AY332958	AY332905	AY333012
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 55023	-----	FJ546478	-----	-----	-----
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 31758			CP000720 ^a		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 32953			NC_006155 ^a		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp5	JQ614049	JQ614043	JQ614037	JQ614031	JQ614025
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp22	JQ614050	JQ614044	JQ614038	JQ614032	JQ614026
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp30	JQ614051	JQ614045	JQ614039	JQ614033	JQ614027
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp31	JQ614052	JQ614046	JQ614040	JQ614034	JQ614028
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp43	JQ614053	JQ614047	JQ614041	JQ614035	JQ614029
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp104	JQ614054	JQ614048	JQ614042	JQ614036	JQ614030
<i>Y. pseudotuberculosis</i> PB 1/+			CP001048 ^a		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> YPIII			CP000950 ^a		
<i>Y. rohdei</i> ATCC 43380 ^T	KC788307	KC788329	KC788351	KC788373	KC788395
<i>Y. rohdei</i> FCF 466	KC788308	KC788330	KC788352	KC788374	KC788396

Continua

Conclusão

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. rohdei</i> IP 8400	KC788309	KC788331	KC788353	KC788375	KC788397
<i>Y. rohdei</i> WA 9/90	KC788398	KC788399	KC788400	KC788401	KC788402
<i>Y. rohdei</i> WA 12/96	AY332844	AY333059	AY332949	AY332896	AY333003
<i>Y. rohdei</i> WA 14/96	AY332845	AY333060	AY332950	AY332897	AY333004
<i>Y. rohdei</i> WE 38/00	AY332847	AY333062	AY332952	AY332899	AY333006
<i>Y. rohdei</i> WS 59/02	AY332848	AY333063	AY332953	AY332900	AY333007
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473 ^T	FJ518778	FJ518730	FJ518742	FJ518754	FJ518766
<i>Y. ruckeri</i> FCF 229	FJ518776	FJ518728	FJ518740	FJ518752	FJ518764
<i>Y. ruckeri</i> FCF 231	FJ518777	FJ518729	FJ518741	FJ518753	FJ518765
<i>Y. ruckeri</i> WS 10/95	AY332849	AY333064	AY332954	AY332901	AY333008
<i>Y. ruckeri</i> WS 20/94	AY332850	AY333065	AY332955	AY332902	AY333009
<i>Y. ruckeri</i> WS 25/94	AY332851	AY333066	AY332956	AY332903	AY333010
<i>Y. ruckeri</i> WS 34/93	AY332852	AY333067	AY332957	AY332904	AY333011

^T, linhagem tipo da espécie; ^a, número de acesso do genoma completo

Para a identificação dos SNPs presente em cada um dos *loci* analisados em cada uma das espécies de *Yersinia*, as sequências de um mesmo fragmento gênico das diferentes linhagens representativas de uma mesma espécie de *Yersinia* foram comparadas visualmente com o auxílio do programa *ChromasPro* versão 1.5 (*Technelysium Pty LTD*).

4.8. Construção dos *primers*

Após a identificação dos SNPs presentes nos diferentes genes analisados para cada uma das espécies de *Yersinia* estudadas, foram construídos *primers* para a amplificação de regiões que flanqueiam cada um dos diferentes SNPs encontrados, com o auxílio do *software* *PrimerQuest*SM (*Integrated DNA Technologies*) disponível *on-line* no endereço <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>.

A predição de estruturas secundárias (*self-dimer*, *cross-dimer*, *hairpins* e palíndromos) e do cálculo das energias de ligação (ΔG) foram realizados com o auxílio do *software* *OligoAnalyser* versão 3.1 (*Integrated DNA Technologies*) disponível *on-line* no endereço <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>.

Os *primers* construídos seguiram, sempre que possível, os seguintes critérios: *primers* que gerassem amplicons de 80-300 pb; *primers* com 18-30 nucleotídeos em tamanho; temperatura de *melting* (T_M) de pelo menos 56°C; T_M similar para *forward* e *reverse*; conteúdo de GC de 40-60%; ausência de complementaridade de 2-3 bases na extremidade 3' no *primer* e entre *primers* de um mesmo par e ausência de sequências de 3 ou mais G e/ou C na extremidade 3' de cada *primer* (ERALI; WITTWER, 2010; WU et al., 2008).

Após a construção dos pares de *primers*, a sequência de cada par foi comparada no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) para verificar sua especificidade com o fragmento gênico analisado da espécie de *Yersinia* em questão. Caso houvesse similaridade com outro fragmento gênico da espécie analisada, o *primer* seria redesenhado.

A especificidade de cada par de *primer* foi confirmada usando eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5% preparado em tampão TAE 1X e, posteriormente, através da análise de *melting* do *amplicon* gerado. Cada corrida eletroforética continha o marcador de peso molecular 25 bp *DNA Ladder* (*Life Technologies*). A eletroforese foi conduzida a 70 Volts por 4 horas e 30 minutos. Os produtos de amplificação foram corados com *GelRed*TM 10.000X 1% (v/v) (*Biotium, Inc*) e observados em transluminador ultravioleta *Gel Doc XR* (*Bio-Rad Laboratories*) e registrados em *software* fotográfico *Quantity One* versão 4.6.1 (*Bio-Rad Laboratories*).

4.9.Otimização da temperatura de hibridação para os *primers* construídos

A determinação da temperatura de hibridação dos *primers* construídos foi realizada através de um gradiente de temperatura variando de 53 a 57°C com incrementos de 1°C.

Com os cinco valores para a temperatura de hibridação, fez-se uma reação de PCR convencional utilizando-se o termociclador *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories)*, segundo as condições descritas por Souza et al. (2010), com o intuito de estabelecer-se a melhor temperatura de hibridação para cada par de *primer*.

A Tabela 15 traz a descrição dos reagentes utilizados para a otimização da temperatura de hibridação para os *primers* construídos.

Tabela 15. Descrição dos reagentes utilizados para a otimização da temperatura de hibridação para os *primers* construídos (SOUZA et al., 2010)

Componentes	Volume (µL)
10X Tampão “PCR Buffer” ^a	5
10 mM “dNTP mixture” ^a	1
<i>Primer</i> forward (10 pmol/µL) ^a	2,5
<i>Primer</i> reverse (10 pmol/µL) ^a	2,5
50 mM de MgSO ₄ ^a	2
DNA genômico (10 ng/µL)	5
Taq DNA Polimerase (1U/µL) ^a	1
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50

^a Produto *Life Technologies*

As condições das reações de amplificação foram as seguintes:

- Desnaturação – 94°C por 5 minutos

Em seguida, 35 ciclos constituídos de:

- Desnaturação – 94°C por 45 segundos
- Hibridação – X°C por 45 segundos (X – temperatura de hibridação)

- Extensão – 72°C por 1 minuto

Após os 35 ciclos foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Reações sem DNA foram usadas como controle negativo em todas as temperaturas.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5% preparado com TAE 1X, corados com *GelRed*TM 10.000X 1% (v/v) (*Biotium, Inc*) e observados em transluminador ultravioleta *Gel Doc XR* (*Bio-Rad Laboratoies*) e registrados em *software* fotográfico *Quantity One* versão 4.6.1 (*Bio-Rad Laboratories*).

4.10. Determinação dos SNPs por HRMA

Para a determinação dos SNPs por HRMA, primeiramente foi realizada uma PCR em tempo real (qPCR) utilizando-se o termociclador *7500 FAST Real-Time PCR System* (*Life Technologies*) com o auxílio do *software 7500* versão 2.0.5 (*Life Technologies*). As reações foram realizadas em placa de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (*Life Technologies*) cobertas com adesivo ótico *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (*Life Technologies*).

A Tabela 16 mostra os reagentes utilizados para as reações de qPCR.

Tabela 16 – Descrição dos reagentes utilizados para as reações de PCR em tempo real

Componentes	Volume (µL)
<i>MeltDoctor</i> TM <i>HRM Master Mix</i> ⁽¹⁾	10,0
<i>Forward</i> (5 pmol/µL) ⁽²⁾	1,2
<i>Reverse</i> (5 pmol/µL) ⁽²⁾	1,2
DNA genômico (4,5 – 5,5 ng/µL)	4,0
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ⁽¹⁾	3,6

⁽¹⁾ Produto *Life Technologies*; ⁽²⁾ Produto *Integrated DNA Technologies*

As condições das reações de qPCR foram as seguintes:

- Desnaturação e ativação enzimática – 95°C por 10 minutos

Em seguida, 45 ciclos constituídos de:

- Desnaturação – 95°C por 15 segundos
- Hibridação e extensão – 55°C por 1 minuto

Todas as reações foram realizadas em duplicata. Reações sem DNA foram utilizadas como controle negativo.

A etapa de HRMA foi realizada imediatamente após a reação de qPCR. Os *amplicons* foram aquecidos a 95°C por 10 segundos e, então, resfriados a 60°C por 1 minuto. As curvas de *melting* de cada *amplicon* foram geradas a partir do aumento gradual de temperatura de 60 a 95°C com incrementos de 1,6°C/s e detecção da fluorescência a cada 0,1 segundo. A fim de uniformizarem-se os dados, as curvas de *melting* brutas anteriormente obtidas foram normalizadas a partir da seleção manual de duas regiões, uma delas ocorrendo anteriormente ao início da dissociação do *amplicon* (100% de fluorescência) e outra, após a completa separação da dupla fita de DNA (0% de fluorescência). As curvas de *melting* normalizadas foram analisadas com o *software HRM* versão 2.0.1 (*Life Technologies*) de acordo com as instruções do fabricante. O *software* agrupa *amplicons* que possuem curvas de *melting* normalizadas similares e, dessa maneira, diferenças entre grupos distintos de *amplicons* podem ser facilmente identificadas.

Os nucleotídeos apenas foram definidos nas reações cujas duplicatas apresentaram o mesmo perfil de *melting* em um mesmo experimento para o fragmento gênico sob análise. O sequenciamento prévio dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* de cada uma das linhagens de *Yersinia* utilizadas permitiu estabelecer-se a correlação entre o nucleotídeo presente na sequência e os diferentes perfis de *melting* obtidos para cada um dos fragmentos gênicos analisados por HRMA.

4.11. Construção dos dendrogramas de similaridade genética

Após a determinação dos nucleotídeos dos SNPs presentes nos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* para cada uma das linhagens de *Yersinia* spp. estudadas, foi construído um dendrograma de similaridade genética para cada uma das espécies baseado em uma sequência linear formada pelos nucleotídeos determinados por HRMA para as linhagens representativas das diversas espécies de *Yersinia* listadas na Tabela 9.

O dendrograma de similaridade genética foi construído no programa *BioNumerics* versão 5.1 (*AppliedMaths N.V.*), utilizando-se o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Visando aumentar a confiabilidade dos resultados das análises filogenéticas, foi utilizado o valor de *bootstrap* (1.000 replicatas) para agregar maior confiança aos dendrogramas de similaridade genética construídos.

4.12. Genotipagem de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA

Após a otimização das condições de reação para a diferenciação dos SNPs encontrados nos *loci* analisados em *Y. pseudotuberculosis*, a técnica foi aplicada para a genotipagem de 40 linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* isoladas no Brasil e que encontram-se discriminadas na Tabela 10. A utilização das linhagens ATCC 29833^T, Yp22, Yp43, Yp30 e Yp31 cujas sequências eram conhecidas como controles de mutação permitiu a identificação dos nucleotídeos nas linhagens testadas.

Após a identificação dos nucleotídeos nas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* testadas, construiu-se um dendrograma de similaridade genética conforme descrito no item 3.11.

4.13. Genotipagem de *Y. enterocolitica* por HRMA

Após a otimização das condições de reação para a diferenciação dos SNPs encontrados nos *loci* analisados em *Y. enterocolitica*, a técnica foi aplicada para a genotipagem de 50

linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* e que encontram-se discriminadas na Tabela 11. A utilização das linhagens ATCC 9610^T, 8081, FCF 352 e FCF 505 cujas sequências eram conhecidas como controles de mutação permitiu a identificação dos nucleotídeos nas linhagens testadas.

Após a identificação dos nucleotídeos nas linhagens de *Y. enterocolitica* testadas, construiu-se um dendrograma de similaridade genética conforme descrito no item 3.11.

4.14. Diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA

Após o sequenciamento de um fragmento interno do gene 16S rRNA descrito por Kotetishvili et al. (2005) percebeu-se uma região específica que poderia ser utilizada para diferenciar-se as espécies enteropatogênicas de *Yersinia*. De maneira similar ao descrito nos itens 3.8 e 3.9 foi construído um par de *primer* com o intuito de diferenciar por HRMA as espécies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*.

Foram utilizadas 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* e 50 linhagens de *Y. enterocolitica* que encontram-se relacionadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

A discriminação entre as duas espécies foi realizada conforme descrito no item 3.10.

5. Resultados

“Há três métodos para ganhar sabedoria:
primeiro, por reflexão, que é o mais nobre;
segundo, por imitação, que é o mais fácil;
e terceiro, por experiência, que é o mais amargo”
(Confúcio)

5. RESULTADOS

5.1.Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica

Os resultados da verificação da pureza e a reconfirmação bioquímica das linhagens de *Yersinia* spp. listadas nas Tabelas 9, 10 e 11, com exceção das duas linhagens de *Y. pestis* listadas, estão apresentados nos Apêndices I e II, respectivamente.

Todas as linhagens foram reconfirmadas como sendo das espécies apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11.

5.2.Reconfirmação sorológica e dos biotipos

Todas as linhagens bacterianas listadas nas Tabelas 9, 10 e 11 com o antígeno “O” especificado apresentaram o mesmo antígeno O como previamente determinado.

Todas as linhagens de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei* apresentaram o mesmo biotipo como previamente determinado nas Tabelas 9, 10 e 11. Os resultados da reconfirmação dos biotipos das linhagens de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei* estão apresentados nos Apêndices III, IV, V e VI, respectivamente.

5.3.Extração de DNA genômico

A integridade do DNA genômico extraído foi visualizada através de uma eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% para todas as linhagens de *Yersinia* spp. listadas nas Tabelas 9, 10 e 11.

A Figura 4 traz um gel representativo de uma eletroforese para avaliação dessa integridade.

Todas as linhagens estudadas apresentaram pureza entre 1,75 e 2,0.

Figura 4. Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder* - *Life Technologies*). Canaletas de 1 a 18, linhagens representativas de *Yersinia* spp. estudadas: ATCC 43970^T (1), ATCC 9610^T (2), 8081 (3), ATCC 33641^T (4), FCF 412 (5), ATCC 29909^T (6), IP 8181 (7), ATCC 33638^T (8), FCF 410 (9), ATCC 43969^T (10), WA 751 (11), CCUG 53443^T (12), FCF 457 (13), ATCC 29833^T (14), Yp22 (15), Yp32 (16), ATCC 43389^T (17) e ATCC 29473^T (18).

5.4. Identificação dos SNPs nas diferentes espécies de *Yersinia* estudadas

Para a identificação dos SNPs presentes nas diferentes espécies de *Yersinia* estudadas foi necessária a amplificação e sequenciamento dos fragmentos dos *loci* 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* das 55 linhagens de *Yersinia* spp. listadas na Tabela 9.

Os produtos de amplificação desses genes para as linhagens ATCC 9610^T e ATCC 29833^T podem ser observados na Figura 5.

Figura 5. Gel representativo dos produtos da amplificação dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%. M: marcador de peso molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder* - *Life Technologies*). 1: *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T. 2: *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833^T.

Após a amplificação de fragmentos dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* os produtos de amplificação foram sequenciados. As sequências obtidas foram documentadas em eletroferogramas na extensão *abd* e foram analisadas pelo programa *ChromasPro* versão 1.5 para verificação da qualidade das mesmas. A Figura 6 ilustra partes de quatro eletroferogramas do fragmento 16S rRNA referente à linhagem *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T obtidos após o sequenciamento nos quais as sequências foram consideradas ótimas para análise dos dados.

Figura 6. Fragmentos representativos em formato de eletroferograma de seqüências do fragmento 16S rRNA referente à linhagem *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T obtidos após o sequenciamento.

Após o alinhamento e análise das seqüências pelo programa *ChromasPro* versão 1.5 das duas seqüências *forward* e duas seqüências *reverse* para cada um dos cinco fragmentos gênicos analisados, pode-se obter uma seqüência consenso para cada linhagem estudada.

A Figura 7 ilustra o alinhamento de duas seqüências *forward* e duas seqüências *reverse* do fragmento 16S rRNA referente à linhagem *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833^T para a obtenção da seqüência consenso.

Figura 7. Alinhamento de sequências pelo programa *ChromasPro* versão 1.5 de duas sequências *forward* e duas sequências *reverse* do fragmento 16S rRNA referente à linhagem *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833^T para a obtenção da sequência consenso.

Após a obtenção das sequências consenso para cada um dos fragmentos analisados de cada uma das linhagens de *Yersinia* spp. estudadas, as sequências de um mesmo fragmento gênico das diferentes linhagens representativas de uma mesma espécie de *Yersinia* foram alinhadas e comparadas visualmente no programa *ChromasPro* versão 1.5 no intuito de identificar-se os SNPs presentes.

A Figura 8 ilustra o alinhamento de sequências do gene 16S rRNA das linhagens representativas de *Y. pseudotuberculosis* no qual é possível identificar-se a presença de um SNP.

Figura 8. Alinhamento de sequências do gene 16S rRNA das linhagens representativas de *Y. pseudotuberculosis*. A seta indica a presença de um SNP.

Foram encontrados SNPs em pelo menos um dos cinco fragmentos dos genes analisados em todas as espécies de *Yersinia* estudadas, com exceção de *Y. pestis*, que não apresentou diferenças intra-espécie nas sequências de nucleotídeos dos fragmentos 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* entre as linhagens analisadas. As espécies *Y. massiliensis*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* apresentaram grande variabilidade intra-espécie, o que impossibilitou a identificação de SNPs que pudessem ser diferenciados por HRMA nos fragmentos dos genes citados acima.

A Tabela 17 sumariza o número de SNPs passíveis de serem diferenciados por HRMA em cada um dos cinco fragmentos gênicos analisados para cada uma das espécies de *Yersinia* aqui estudadas.

Tabela 17 – Número de SNPs passíveis de serem diferenciados por HRMA encontrados nos fragmentos gênicos analisados em cada uma das espécies de *Yersinia* estudadas

Espécies de <i>Yersinia</i>	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
<i>Y. pestis</i>	0	0	0	0	0
<i>Y. massiliensis</i>	0	0	0	0	0
<i>Y. frederiksenii</i>	0	0	0	0	0
<i>Y. kristensenii</i>	0	0	0	0	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	1	3	4	0	2
<i>Y. enterocolitica</i>	1	4	0	5	0
<i>Y. bercovieri</i>	3	1	3	1	1
<i>Y. intermedia</i>	1	1	1	1	0
<i>Y. mollaretii</i>	1	0	0	0	0
<i>Y. rohdei</i>	0	1	1	1	3
<i>Y. ruckeri</i>	0	0	1	0	0

5.5. Construção dos pares de *primers*

Após a definição dos SNPs passíveis de serem diferenciados por HRMA, foram construídos *primers* para a amplificação das regiões que flanqueiam cada um dos SNPs encontrados.

As Tabelas 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 mostram, respectivamente, as informações sobre os diferentes pares de *primers* que foram utilizados para a diferenciação por HRMA dos diferentes SNPs em *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri* e *Y. rohdei*.

Tabela 18 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
16S rRNA	A/G	16S rRNA-SNP1	GGCGGACGGGTGAGTAATGT TCAGACCAGCTAGGGATCGT	195	80,75 – 85,25
<i>glnA</i>	T/C	<i>glnA</i> -SNP1	TCCGTTGTGACATTCTTGAGCC GATACGTGTGACCCATTGATGCTG	190	77,50 – 86,00
<i>glnA</i>	T/C	<i>glnA</i> -SNP2	CGTTCTATCTCCAAACGTGCTG AGGAACAGGGAAGTAACCGCCTTT	237	79,00 – 85,25
<i>glnA</i>	A/G	<i>glnA</i> -SNP3	CACCAAATACGAAGGCGGCAACAA ACACATGGCAGAACGGAGGTCTT	106	80,00 – 84,75
<i>gyrB</i>	T/C e T/C ⁽¹⁾	<i>gyrB</i> -SNP1-2	GAAGGTAAAGTTCACGAGCAAACC ACACCCGAGTTCAGGAAAGAGAGT	194	79,00 – 86,00
<i>gyrB</i>	C/T	<i>gyrB</i> -SNP3	GAAGTCTCTTTCCTGAACTCGGGTGT TCGTCTTTCATGGTGGAGAAGTAG	170	75,25 – 79,50
<i>gyrB</i>	A/G	<i>gyrB</i> -SNP4	AACAAGAACCCGATCCACCCGAAA TACCACCATCACGCTGTGGAATGT	145	77,25 – 81,75
<i>recA</i>	C/T	<i>recA</i> -SNP1	GCCCAGAATCATCAGGTAAGACGA TGATAACGTCAACCGCACCAGA	228	79,00 – 84,25
<i>recA</i>	C/T	<i>recA</i> -SNP2	CTCTGGTGCGGTTGACGTTAT GCCTGGCTCATCATACGC	120	76,50 – 85,00

⁽¹⁾ o par de *primers* flanqueia dois SNPs

Tabela 19 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. enterocolitica* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
16S rRNA	C/T	16S rRNA-SNP1	GAGCGGCAGCGGGAAGTAGTTTA TCCATCAGGCAGTTTCCCAGACAT	80	79,00 – 86,00
<i>glnA</i>	T/C	<i>glnA</i> -SNP1	AGGCATTAACGAATCCGACATGGT TGGCTCAAGGATGTCACAACGGAT	109	77,00 – 83,50
<i>glnA</i>	T/C e T/C ⁽¹⁾	<i>glnA</i> -SNP2-3	TATCCGTTGTGACATCCTTGAGCC CGAACGTCGTCGAACAGGAAGAA	159	78,00 – 85,00
<i>glnA</i>	T/C	<i>glnA</i> -SNP4	TTGTTTGGGCCAGAGCCAGAAT TTGTTGCCGCCTTCGTATTTGGTG	134	79,50 – 85,50
<i>hsp60</i>	G/T	<i>hsp60</i> -SNP1	ATCTCTAACATCCGCGAAATGCTGCC TAACCACCAGAGTTGCCAGAGCTT	115	78,00 – 85,00
<i>hsp60</i>	T/A e C/T ⁽¹⁾	<i>hsp60</i> -SNP2-3	GAAGATGTTGAAGGCGAAGCTCTG TCTTGCAGCATGGCTTTACGAC	119	78,50 – 85,50
<i>hsp60</i>	C/T e C/T ⁽¹⁾	<i>hsp60</i> -SNP4-5	ATATCGCTACCCTGACTGCGG ATAACAACACGTTTCGCCTGACCC	103	75,50 -83,50

⁽¹⁾ o par de *primers* flanqueia dois SNPs

Tabela 20 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. bercovieri* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→ 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Intervalo de melting (°C)
16S rRNA	T/C	16S rRNA-SNP1	AGCGGCAGCGGGAAGTAGTTTA GCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCC	105	78,50 – 86,00
16S rRNA	T/C	16S rRNA-SNP2	GGCGGACGGGTGAGTAATGT TCAGACCAGCTAGGGATCGT	195	80,50 – 86,00
16S rRNA	G/T	16S rRNA-SNP3	ATGACCAGCCACACTGGAAGTGA TTAACACGACTGCCTTCCTCCT	164	81,00 – 87,50
<i>glnA</i>	T/G	<i>glnA</i> -SNP1	CGCTGTTATGGACCCGTTCTTC AACCACGGATGCTGCTACCAAA	221	80,00 – 85,00
<i>gyrB</i>	G/A e G/A ⁽¹⁾	<i>gyrB</i> -SNP1-2	CGAGACCTTCACCAATAACACC GCTCAGATACTCAACAAACGCC	172	75,50 – 83,00
<i>gyrB</i>	C/T	<i>gyrB</i> -SNP3	CAAGGCGTTTGTGAGTATCTGAGC TCCTGGAAACCATCATTCCACTGC	126	75,50 – 83,00
<i>hsp60</i>	C/T	<i>hsp60</i> -SNP1	ACTGGCGGTACTGTTATCTCTG CTTTGTCGTAGTCAGAAGTCGCATC	202	75,50 – 83,00
<i>recA</i>	A/C	<i>recA</i> -SNP1	TCTCAGCCAGATACGGGCGAACAA TGTCATGCTGCCACGGAGTCAA	102	80,00 – 86,50

Tabela 21 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. intermedia* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
16S rRNA	T/C	16S rRNA-SNP1	ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGA TAGCTAATCCCATCTGGGCACATC	131	78,50 – 86,00
<i>glnA</i>	T/G	<i>glnA</i> -SNP1	TTGACGATGTTTCGTTTCGGCAGCA TTTAGTGCTGGAGTTCCATGCGCCTT	86	76,50 – 85,50
<i>gyrB</i>	T/C	<i>gyrB</i> -SNP1	AAACCCGATCCACCCGAAAGTGTT ATCGCGCTGCGGAATGTTATTGGT	133	75,00 – 81,50
<i>hsp60</i>	A/G	<i>hsp60</i> -SNP1	TCCTGCTGGCTGACAAGAAA TGGTTTACCGGCTTTCGCTAC	80	76,50 – 83,50

⁽¹⁾ o par de *primers* flanqueia dois SNPs

Tabela 22 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. mollaretii* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
16S rRNA	A/G	16S rRNA-SNP1	TAATACCGCATGACCTCGCAAGAG TCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGT	158	82,00 – 86,50

Tabela 23 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. ruckeri* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do amplicon (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
<i>gyrB</i>	G/A e G/A ⁽¹⁾	<i>gyrB</i> -SNP1-2	AGTTGGTGATTTCGCCGTGAAGGTA AAGCTCGGCCAGAAACGCA	127	76,50 – 83,00

⁽¹⁾ o par de *primers* flanqueia dois SNPs

Tabela 24 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a genotipagem de *Y. rohdei* por HRMA

Gene	SNP	Nomenclatura do SNP	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do amplicon (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
<i>glnA</i>	A/T	<i>glnA</i> -SNP1	TTATGACCGCGACCCACGTTCTATCT CCGAACAGCACGGTATCTGCAA	84	75,00 – 82,50
<i>gyrB</i>	A/G	<i>gyrB</i> -SNP1	TGAAAGTTGTGGGCGAAACCGA CGGTGTTATTGGTGAACGTCTGGAA	81	77,00 – 87,00
<i>hsp60</i>	T/C	<i>hsp60</i> -SNP1	TGCGCGGCATTGTAAAGTAGCAG TGCCTGACCCAAATCTTCCAGAGT	161	76,00 – 85,00
<i>recA</i>	T/G	<i>recA</i> -SNP1	GAGATTTATGGCCCAGAGTCATCG AGCATAGATAGGGTCAAGAGCAT	126	78,50 – 85,50
<i>recA</i>	T/C	<i>recA</i> -SNP2	CATGCTCTTGACCCTATCTATGCT AGATTTC AACGCTTGCTCACC	97	72,00 – 79,00
<i>recA</i>	A/G	<i>recA</i> -SNP3	AGATACTGGTGAGCAAGCGTTGGA ATCATACGTGCAGCAAGGCCCATATA	156	75,50 – 84,50

5.6.Otimização da temperatura de hibridação dos pares de *primers* construídos

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das diferentes temperaturas de hibridação testadas para os diversos pares de *primers* construídos. Dessa maneira, a temperatura de 55°C foi escolhida para ser utilizadas nas reações de qPCR.

A Figura 9 ilustra a otimização da temperatura de hibridação para o par de *primer glnA*-SNP4 de *Y. enterocolitica*. Os produtos de amplificação desse fragmento para as linhagens ATCC 9610^T e 8081 podem ser observados na Figura 9.

Não há diferenças significativas em relação à especificidade do par de *primer* nas diferentes temperaturas de hibridação testadas.

Figura 9. Produtos de amplificação do par de *primers glnA*-SNP4 de *Y. enterocolitica* em diferentes temperaturas de hibridação após eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5%. M: marcador de peso molecular (25 bp *DNA Ladder* - *Life Technologies*). CN: controle negativo. 1: *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T. 2: *Y. enterocolitica* 8081.

5.7.Determinação dos SNPs por HRMA

5.7.1. *Y. pseudotuberculosis*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar os SNPs presentes em seis das nove regiões analisadas nas sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* testadas e listadas na Tabela 9.

As Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 trazem, respectivamente, os perfis de *melting* dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. pseudotuberculosis*.

As linhagens de *Y. pseudotuberculosis* testadas não apresentaram diferenças de nucleotídeos nos fragmentos *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP3 e *recA*-SNP1.

Figura 10. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de 16S rRNA-SNP1 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil verde caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil vermelho as linhagens com guanina (G).

Figura 11. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP1 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil amarelo caracteriza as linhagens com timina (T).

Figura 12. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP2 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil roxo caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho as linhagens com citosina (C).

Figura 13. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP3 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil verde caracteriza as linhagens com adenina (A).

Figura 14. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *gyrB*-SNP1-2 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina e timina (T-T) e o perfil azul as linhagens com citosina e citosina (C-C).

Figura 15. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *gyrB*-SNP3 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho as linhagens com citosina (C).

Figura 16. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *gyrB*-SNP4 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil azul caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil verde caracteriza as linhagens com guanina (G).

Figura 17. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *recA*-SNP1 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil azul caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 18. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *recA*-SNP2 de *Y. pseudotuberculosis*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul as linhagens com citosina (C).

5.7.2. *Y. enterocolitica*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar, diretamente, os SNPs presentes em seis das sete regiões analisadas nas sete linhagens de *Y. enterocolitica* testadas e listadas na Tabela 9. Por outro lado, a separação dos SNPs presentes no fragmento *hsp60*-SNP1 só foi possível com a construção de heteroduplex com DNA da linhagem *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T, que possui uma guanina (G) nessa posição.

As Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24 trazem, respectivamente, os perfis de *melting* dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. enterocolitica* e que foram separados por reações diretas. A Figura 25 traz o perfil de *melting* do fragmento *hsp60*-SNP1 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. enterocolitica* cujos perfis de *melting* só foram separados após a construção de heteroduplex.

Figura 19. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de 16S rRNA-SNP1 de *Y. enterocolitica*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil roxo as linhagens com citosina (C).

Figura 20. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP1 de *Y. enterocolitica*. O perfil verde caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho as linhagens com citosina (C).

Figura 21. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP2-3 de *Y. enterocolitica*. O perfil verde caracteriza as linhagens com timina e timina (T-T), o perfil vermelho caracteriza as linhagens com citosina e timina (C-T) e o perfil azul as linhagens com citosina e citosina (C-C).

Figura 22. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *glnA*-SNP4 de *Y. enterocolitica*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul as linhagens com citosina (C).

Figura 23. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *hsp60*-SNP2-3 de *Y. enterocolitica*. O perfil azul caracteriza as linhagens com adenina e timina (A-T) e o perfil vermelho as linhagens com timina e citosina (T-C).

Figura 24. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento de *hsp60*-SNP4-5 de *Y. enterocolitica*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina e citosina (T-C) e o perfil verde as linhagens com citosina e citosina (C-C).

Figura 25. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *hsp60*-SNP1 de *Y. enterocolitica* após a construção do heteroduplex com DNA da linhagens ATCC 9610^T. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T), o perfil vermelho caracteriza as linhagens com citosina (C) e o perfil verde as linhagens com guanina (G).

5.7.3. *Y. bercovieri*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar os SNPs presentes em seis das oito regiões analisadas nas três linhagens de *Y. bercovieri* testadas e listadas na Tabela 9.

As Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 trazem, respectivamente, os perfis de *melting* dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, 16S rRNA-SNP2, 16S rRNA-SNP3, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *hsp60*-SNP1 e *recA*-SNP1 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. bercovieri*.

As linhagens de *Y. bercovieri* testadas não apresentaram alterações de nucleotídeos nos fragmentos 16S rRNA-SNP3 e *glnA*-SNP1.

Figura 26. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de *Y. bercovieri*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho as linhagens com citosina (C).

Figura 27. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP2 de *Y. bercovieri*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho as linhagens com citosina (C).

Figura 28. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP3 de *Y. bercovieri*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com guanina (G).

Figura 29. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *glnA*-SNP1 de *Y. bercovieri*. O perfil verde caracteriza as linhagens com timina (T).

Figura 30. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *gyrB*-SNP1-2 de *Y. bercovieri*. O perfil azul caracteriza as linhagens com adenina e adenina (A-A) e o perfil vermelho caracteriza as linhagens com guanina e guanina (G-G).

Figura 31. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *gyrB*-SNP3 de *Y. bercovieri*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 32. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *hsp60*-SNP1 de *Y. bercovieri*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 33. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *recA*-SNP1 de *Y. bercovieri*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil azul caracteriza as linhagens com citosina (C).

5.7.4. *Y. intermedia*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar os SNPs presentes nas quatro regiões analisadas nas sete linhagens de *Y. intermedia* testadas e listadas na Tabela 9.

As Figuras 34, 35, 36 e 37 trazem, respectivamente, os perfis de *melting* dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1 e *hsp60*-SNP1 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. intermedia*.

Figura 34. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de *Y. intermedia*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 35. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *glnA*-SNP1 de *Y. intermedia*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (G).

Figura 36. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *gyrB*-SNP1 de *Y. intermedia*. O perfil azul caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil vermelho caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 37. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *hsp60*-SNP1 de *Y. intermedia*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (G).

5.7.5. *Y. mollaretii*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar os SNPs presentes na região analisada nas quatro linhagens de *Y. mollaretii* testadas e listadas na Tabela 9.

A Figura 38 traz os perfis de *melting* do fragmento 16S rRNA-SNP1 utilizado para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. mollaretii*.

Figura 38. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento 16S rRNA-SNP1 de *Y. mollaretii*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (G).

5.7.6. *Y. ruckeri*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar os SNPs presentes na região analisada nas três linhagens de *Y. ruckeri* testadas e listadas na Tabela 9.

A Figura 39 traz os perfis de *melting* do fragmento *gyrB*-SNP1-2 utilizado para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. ruckeri*.

Figura 39. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *gyrB*-SNP1-2 de *Y. ruckeri*. O perfil verde caracteriza as linhagens com guanina e adenina (G-A) e o perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina e guanina (A-G).

5.7.7. *Y. rohdei*

A técnica de HRMA conseguiu diferenciar, diretamente, os SNPs presentes em cinco das seis regiões analisadas nas quatro linhagens de *Y. rohdei* testadas e listadas na Tabela 9. Por outro lado, a separação dos SNPs presentes no fragmento *glnA*-SNP1 só foi possível com a construção de heteroduplex com DNA da linhagem *Y. rohdei* ATCC 43380^T, que possui uma timina (T) nessa posição.

As Figuras 40, 41, 42, 43 e 44 trazem, respectivamente, os perfis de *melting* dos fragmentos *gyrB*-SNP1, *hsp60*-SNP1, *recA*-SNP1, *recA*-SNP2 e *recA*-SNP3 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. rohdei* e que foram separados por reações diretas. A Figura 45 traz o perfil de *melting* do fragmento *glnA*-SNP1 utilizados para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. rohdei* cujos perfis de *melting* só foram separados após a construção de heteroduplex.

Figura 40. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *gyrB*-SNP1 de *Y. rohdei*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (G).

Figura 41. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *hsp60*-SNP1 de *Y. rohdei*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 42. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *recA*-SNP1 de *Y. rohdei*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (G).

Figura 43. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *recA*-SNP2 de *Y. rohdei*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T) e o perfil verde caracteriza as linhagens com citosina (C).

Figura 44. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *recA*-SNP3 de *Y. rohdei*. O perfil vermelho caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil azul caracteriza as linhagens com guanina (C).

Figura 45. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento *glnA*-SNP1 de *Y. rohdei* após a construção do heteroduplex com DNA da linhagens ATCC 43380^T. O perfil azul caracteriza as linhagens com adenina (A) e o perfil vermelho caracteriza as linhagens com timina (T).

5.8. Construção dos dendrogramas de similaridade genética

5.8.1. *Y. pseudotuberculosis*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir da junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para cada uma das linhagem de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas. Os 10 nucleotídeos estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>gyrB</i>			<i>recA</i>	
	SNP1	SNP1	SNP2	SNP3	SNP1-2	SNP3	SNP4	SNP1	SNP2
ATCC 29833 ^T	G	T	C	A	C-C	C	G	C	C
Yp5	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
Yp22	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
Yp30	G	T	C	A	C-C	T	A	C	C
Yp31	G	T	C	A	C-C	T	A	C	C
Yp43	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
Yp104	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados para as sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas para a otimização da

técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. pseudotuberculosis* discriminou as diferentes linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* em *clusters* bio-sorogrupos-específicos. O primeiro deles, denominado “A”, foi composto pelas linhagens do bio-sorogrupos 1/O:1 e o segundo, denominado “B”, foi formado pelas linhagens pertencentes ao bio-sorogrupos 2/O:3.

A Figura 46 representa o dendrograma de similaridade genética das sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 46. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.2. *Y. enterocolitica*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as sete linhagens de *Y. enterocolitica* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir da junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-

SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5, nessa ordem, para cada uma das linhagem de *Y. enterocolitica* utilizadas. Os 10 nucleotídeos estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>hsp60</i>		
	SNP1	SNP1	SNP2-3	SNP4	SNP1	SNP2-3	SNP4-5
ATCC 9610 ^T	T	T	C-T	T	G	T-C	C-C
8081	C	T	T-T	T	G	T-C	C-C
FCF 108	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 352	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 505	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
IP 7887	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 8239	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados para as sete linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou as sete linhagens testadas em três *clusters*. O primeiro deles, denominado “A”, foi formado por linhagens pertencentes ao biotipo 1B (ATCC 9610^T e 8081). O segundo deles, denominado “B”, foi composto por linhagens dos biotipos 2 (FCF 108), 3 (FCF 352) e 4 (IP 7887 e IP 8239) e o terceiro *cluster*, denominado “C”, foi formado pela linhagem pertencente ao biotipo 1A (FCF 505).

A Figura 47 representa o dendrograma de similaridade genética das sete linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 47. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.3. *Y. bercovieri*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as três linhagens de *Y. bercovieri* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir da junção linear dos nove nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, 16S rRNA-SNP2, 16S rRNA-SNP3, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *hsp60*-SNP1 e *recA*-SNP1, nessa ordem, para cada uma das linhagem de *Y. bercovieri* utilizadas. Os nove nucleotídeos estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das três linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	16S rRNA			<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>
	SNP1	SNP2	SNP3	SNP1	SNP1-2	SNP3	SNP1
ATCC 43970 ¹	T	T	G	T	G-G	C	C
WE 582/87	C	C	G	T	A-A	T	T
IP 7966	C	C	G	T	G-G	C	T

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos nove nucleotídeos encontrados para as linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou cada uma das três linhagens de em ramos linhagem-específicos. Nenhuma correlação epidemiológica significativa entre as linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas foi observada de acordo com sua origem, sorogrupo ou fonte e ano de isolamento.

A Figura 48 representa o dendrograma de similaridade genética das três linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 48. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, 16S rRNA-SNP2, 16S rRNA-SNP3, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *hsp60*-SNP1 e *recA*-SNP1, nessa ordem, para as três linhagens de *Y. bercovieri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.4. *Y. intermedia*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as sete linhagens de *Y. intermedia* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir da junção linear dos quatro nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1 e *hsp60*-SNP1, nessa ordem, para cada uma das linhagem de *Y. intermedia* utilizadas. Os quatro nucleotídeos estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das sete linhagens de *Y. intermedia* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	16S rRNA	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>
	SNP1	SNP1	SNP1	SNP1
ATCC 29909 ^T	T	T	C	A
FCF 297	T	T	C	A
FCF 323	C	G	T	G
FCF 349	T	G	C	G
IP 8181	C	G	C	G
IP 8184	C	G	C	G
IP 8373	T	T	C	A

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos quatro nucleotídeos encontrados para as linhagens de *Y. intermedia* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou as sete linhagens de em quatro *clusters*. Nenhuma correlação epidemiológica significativa entre as linhagens de *Y. intermedia* utilizadas foi observada de acordo com sua origem, sorogrupo ou fonte e ano de isolamento.

A Figura 49 representa o dendrograma de similaridade genética das sete linhagens de *Y. intermedia* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 49. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1 e *hsp60*-SNP1, nessa ordem, para as sete linhagens de *Y. intermedia* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.5. *Y. mollaretii*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as quatro linhagens de *Y. mollaretii* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir de um único SNP passível de ser diferenciado por HRMA e encontrado no fragmento 16S rRNA-SNP1 para cada uma das linhagem de *Y. mollaretii* utilizadas. Esse nucleotídeo está apresentado na Tabela 29.

Tabela 29. Nucleotídeos encontrados no SNP das quatro linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	16S rRNA
	SNP1
ATCC 43969 ^T	A
WE 316/84	A
WA 751	A
WE 19/88	G

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pelo único SNPs passível de ser diferenciado por HRMA e encontrado nas linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou as três linhagens em dois *clusters*. Nenhuma correlação epidemiológica significativa entre as linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas foi observada de acordo com sua origem, sorogrupo ou fonte e ano de isolamento.

A Figura 50 representa o dendrograma de similaridade genética das quatro linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 50. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados no SNP do fragmento 16S rRNA-SNP1 para as quatro linhagens de *Y. mollaretii* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.6. *Y. ruckeri*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as três linhagens de *Y. ruckeri* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir de dois nucleotídeos encontrados no fragmento *gyrB*-SNP1-2 para cada uma das linhagem de *Y. ruckeri* utilizadas. Esses nucleotídeos estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das três linhagens de *Y. ruckeri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	<i>gyrB</i>
	SNP1-2
ATCC 29473 ^T	A-G
FCF 229	G-A
FCF 231	G-A

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos dois nucleotídeos encontrados para as linhagens de *Y. ruckeri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou as três linhagens em dois *clusters*, de acordo com local e fonte de isolamento, bem como de acordo com o sorogrupo das linhagens. O primeiro *cluster*, denominado “A” foi formado pelas linhagens isoladas no Brasil a partir de amostras de carne e pertencentes ao sorogrupo O:25 e o segundo *cluster*, denominado “B” foi formado pela linhagem isolada nos Estados Unidos a partir de peixes com doença da boca vermelha e pertencente ao sorogrupo O:1a.

A Figura 51 representa o dendrograma de similaridade genética das três linhagens de *Y. ruckeri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 51. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs do fragmento *gyrB*-SNP1-2 para as três linhagens de *Y. ruckeri* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.8.7. *Y. rohdei*

Foi construído um dendrograma de similaridade genética para as quatro linhagens de *Y. rohdei* listadas na Tabela 9 e utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

O dendrograma de similaridade genética foi construído a partir da junção linear dos seis nucleotídeos encontrados nos fragmentos *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1, *hsp60*-SNP1, *recA*-SNP1, *recA*-SNP2 e *recA*-SNP3, nessa ordem, para cada uma das linhagem de *Y. rohdei* utilizadas. Os seis nucleotídeos estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das quatro linhagens de *Y. rohdei* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*

Linhagens	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>hsp60</i>	<i>recA</i>		
	SNP1	SNP1	SNP1	SNP1	SNP2	SNP3
ATCC 43380 ^T	T	A	T	T	C	A
WA 9/90	T	A	C	T	C	A
FCF 466	A	A	T	T	C	A
IP 8400	T	G	T	G	T	G

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos seis nucleotídeos encontrados para as linhagens de *Y. rohdei* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia* discriminou cada uma das quatro linhagens de em ramos linhagem-específicos. Nenhuma correlação epidemiológica significativa entre as linhagens de *Y. rohdei* utilizadas foi observada de acordo com sua origem, sorogrupo ou fonte e ano de isolamento.

A Figura 52 representa o dendrograma de similaridade genética das quatro linhagens de *Y. rohdei* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

Figura 52. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos *glnA*-SNP1, *gyrB*-SNP1, *hsp60*-SNP1, *recA*-SNP1, *recA*-SNP2 e *recA*-SNP3, nessa ordem, para as quatro linhagens de *Y. rohdei* utilizadas para a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem dessa espécie de *Yersinia*.

5.9. Genotipagem de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA

Após a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. pseudotuberculosis*, a técnica foi empregada para a genotipagem de 40 linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* isoladas no Brasil. As linhagens ATCC 29833^T, Yp22, Yp43, Yp30 e Yp31 cujas sequências eram conhecidas foram utilizadas como padrão de mutação para os perfis de *melting* o que permitiu a identificação dos nucleotídeos nas linhagens testadas.

A Tabela 32 traz os nucleotídeos encontrados nas 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA.

Tabela 32. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>gyrB</i>			<i>recA</i>	
	SNP1	SNP1	SNP2	SNP3	SNP1-2	SNP3	SNP4	SNP1	SNP2
P1	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P2	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P4	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P8	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P10	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P14	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P15	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P21	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P22	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P26	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P28	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P30	G	T	C	A	C-C	T	A	C	C
P31	G	T	C	A	C-C	T	A	C	C
P32	G	T	C	A	C-C	T	A	C	C
P34	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T

Continua

Conclusão

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>gyrB</i>			<i>recA</i>	
	SNP1	SNP1	SNP2	SNP3	SNP1-2	SNP3	SNP4	SNP1	SNP2
P35	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P37	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P40	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P43	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P45	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P46	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P52	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P57	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P61	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P67	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P70	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P71	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P75	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P78	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P80	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P84	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P85	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P90	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P94	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P95	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P99	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P100	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P101	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P104	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T
P105	A	T	T	A	T-T	C	A	C	T

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

Posteriormente a identificação dos nucleotídeos nas 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA construiu-se um dendrograma de similaridade

genética a partir da junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para cada uma das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas.

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados para as 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA discriminou as diferentes linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia* em *clusters* bio-sorogrupos específicos. O primeiro deles, denominado “A”, foi composto pelas linhagens do bio-sorogrupo 1/O:1 e o segundo, denominado “B”, foi formado pelas linhagens pertencentes ao bio-sorogrupo 2/O:3.

A Figura 53 representa o dendrograma de similaridade genética das 40 linhagens *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA.

Figura 53. Dendrograma de similaridade genética gerado com os nucleotídeos encontrados nos SNPs dos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3, *gyrB*-SNP4, *recA*-SNP1 e *recA*-SNP2, nessa ordem, para cada uma das 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* genotipadas por HRMA.

5.10. Genotipagem de *Y. enterocolitica* por HRMA

Após a otimização da técnica de HRMA para a genotipagem de *Y. enterocolitica*, a técnica foi empregada para a genotipagem de 50 linhagens dessa espécie de *Yersinia* pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 e aos mais diversos sorogrupos. As linhagens ATCC 9610^T, FCF 352, FCF 505 e 8081 cujas sequências eram conhecidas foram utilizadas como padrão de mutação para os perfis de *melting* o que permitiu a identificação dos SNPs nas linhagens testadas. A construção do heteroduplex para a diferenciação dos SNPs presentes no fragmento *hsp60*-SNP1 foi realizada com a adição de DNA da linhagem *Y. enterocolitica* ATCC 9610^T, que possui uma guanina (G) nessa posição.

A Tabela 33 traz os nucleotídeos encontrados nas 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA.

Tabela 33. Nucleotídeos encontrados nos SNPs das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>hsp60</i>		
	SNP1	SNP1	SNP2-3	SNP4	SNP1	SNP2-3	SNP4-5
FCF 125	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
FCF 153	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
FCF 195	C	C	C-T	T	C	A-T	T-C
FCF 387	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
FCF 483	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
FCF 505	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
FCF 571	T	C	C-T	C	G	A-T	T-C
FCF 587	T	C	C-T	T	C	A-T	T-C
FCF 610	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
IP 6883	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C

Continua

Continuação

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>hsp60</i>		
	SNP1	SNP1	SNP2-3	SNP4	SNP1	SNP2-3	SNP4-5
IP 7326	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
IP 8395	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
IP 8396	T	C	C-T	C	C	A-T	T-C
ATCC 9610 ^T	T	T	C-T	T	G	T-C	T-C
8081	C	T	T-T	T	G	T-C	C-C
FCF 197	T	T	C-T	T	G	T-C	C-C
FCF 474	T	T	C-T	T	G	T-C	C-C
FCF 106	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 107	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 108	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 112	T	C	C-C	T	C	T-C	T-C
FCF 116	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 127	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 142	T	C	C-C	T	C	T-C	T-C
FCF 602	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7661	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7662	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7663	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7664	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7665	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 123	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 327	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 329	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 331	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 352	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
CCUG 8233	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 76	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 78	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C

Continua

Conclusão

Linhagens	16S rRNA		<i>glnA</i>		<i>hsp60</i>		
	SNP1	SNP1	SNP2-3	SNP4	SNP1	SNP2-3	SNP4-5
FCF 374	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 380	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 384	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 472	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 600	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 615	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
FCF 626	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 3890	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 7887	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 8016	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
IP 8239	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C
CCUG 8232	T	C	C-C	T	T	T-C	T-C

A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina

Posteriormente a identificação dos nucleotídeos nas 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA construiu-se um dendrograma de similaridade genética a partir da junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5, nessa ordem, para cada uma das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* utilizadas.

O dendrograma de similaridade genética gerado pela junção linear dos 10 nucleotídeos encontrados nas linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA discriminou as 50 linhagens testadas em três *clusters* relacionados ao perfil patogênico dos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica*. O primeiro *cluster*, denominado “A”, foi formado por linhagens do biotipo 1B que são consideradas linhagens altamente patogênicas. O segundo *cluster*, denominado “B”, foi composto pelas linhagens dos biotipos 2, 3, 4 e 5 que são caracterizadas como linhagens patogênicas e o terceiro *cluster*, denominado “C”, foi formado pelas linhagens pertencente ao biotipo 1A que é descrito como um biotipo não patogênico de *Yersinia*.

A Figura 54 representa o dendrograma de similaridade genética das 50 linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA.

5.11. Diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA

Após o sequenciamento do gene 16S rRNA das diversas linhagens representativas das diferentes espécies do gênero *Yersinia* listadas na Tabela 9, percebeu-se a existência de uma região altamente variável entre as diversas espécies do gênero e flanqueada por regiões altamente conservadas, como pode-se observar na Figura 55.

Figura 55. Alinhamento de sequências do gene 16S rRNA das linhagens “tipo” de cada uma das espécies de *Yersinia* mostrando uma região altamente variável flanqueada por regiões altamente conservadas.

Dessa maneira construiu-se um par de *primer* conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5 com o intuito diferenciar-se por HRMA as espécies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* que são comprovadamente espécies enteropatogênicas de *Yersinia*.

A Tabela 34 traz as informações do par de *primer* usado para a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA.

Tabela 34 – Dados gerais sobre os *primers* utilizados para a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Intervalo de <i>melting</i> (°C)
16S rRNA	CGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGA ATTCCGATTAACGCTTGCACCCTC	139	77,0 – 85,0

Para a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA, foram utilizadas 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* dos bio-sorogrupos 1/O:1 e 2/O:3 e 50 linhagens de *Y. enterocolitica* pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5, listadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

A Figura 56 ilustra os diferentes perfis de *melting* encontrados com a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA. As linhagens de *Y. enterocolitica* foram divididas em 2 diferentes perfis de *melting* diferentes, um deles formado pelas linhagens do biotipo 1B e o outro pelas linhagens pertencentes aos biotipo 1A, 2, 3, 4 e 5. Por outro lado, as linhagens de *Y. pseudotuberculosis* foram agrupadas em um único perfil de *melting*, independente do bio-sorogrupo de cada uma delas.

Figura 56. Análise da curva de *melting* normalizada do fragmento do gene 16S rRNA utilizado para a diferenciação de *Y. enterocolitica* de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA. O perfil verde caracteriza as linhagens de *Y. enterocolitica* pertencente ao biotipo 1B; o perfil vermelho caracteriza as linhagens de *Y. enterocolitica* pertencente aos biotipos 1A, 2, 3, 4 e 5 e o perfil roxo caracteriza as linhagens de *Y. pseudotuberculosis*.

6. Discussão

“Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro”
(Santiago Ramón y Cajal)

6. DISCUSSÃO

A utilização de métodos fenotípicos para estudos epidemiológicos foi prevalente em relação a outros métodos até o início da década de 1990. Entretanto, esses métodos convencionais são baseados em característica fenotípicas que podem ou não estar sendo expressas em determinado momento e possuem baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de um mesmo gênero ou espécie (MIGNARD; FLANDROIS, 2006; OLIVE; BEAN, 1999).

Em função desses problemas inerentes aos testes fenotípicos muitos métodos genotípicos têm sido utilizados, nas últimas décadas, para a caracterização de diferentes linhagens em estudos epidemiológicos e vêm substituindo os testes fenotípicos convencionais (OLIVE; BEAN, 1999).

Dentre as diversas metodologias moleculares utilizadas em estudos genéticos de populações bacterianas, os métodos baseados em sequências podem ser considerados os mais eficientes em termos de reprodutibilidade e facilidade de compartilhamento de informações entre diferentes laboratórios. Entretanto, o sequenciamento de um grande número de genes de um grande número de amostras ainda é trabalhoso e caro e permanece irreal para muitos laboratórios (LÉVESQUE et al., 2011).

Em 2002, a partir de uma colaboração entre pesquisadores e indústria, foi introduzida a técnica de HRMA que pode ser considerada o mais simples método para a genotipagem e determinação de mutações e, por isso, uma alternativa promissora para estudos epidemiológicos de diversas espécies de micro-organismos (ARANCIA et al., 2011; CHENG et al., 2006; FORTINI et al., 2007; JEFFERY et al., 2007; LIEW et al., 2004; LÉVESQUE et al., 2011; RICHARDSON et al., 2011; STEPHENS et al., 2008; WU et al., 2008).

A utilização de genes conservados, como os genes utilizados nesse estudo, para o estabelecimento de relações epidemiológicas entre linhagens bacterianas facilita a detecção de SNPs que possam ser utilizados na genotipagem. Entretanto, o uso de SNPs para estudos filogenéticos de populações ainda é recente e muitas questões sobre o número de SNPs necessários para obterem-se resultados fiéis à história genética da população ainda persistem (MORIN; MARTIEN; TAILOR, 2009).

O que se pode afirmar é que o uso de múltiplos *loci* é essencial para conseguir a resolução necessária para o estabelecimento de relações significativas entre linhagens, pois a diversidade de clones poderia influenciar numa tipagem incorreta se apenas um único *locus* fosse examinado (BRITO; EDWARDS, 2009; HARPENDING et al., 1998; MAIDEN et al., 1998).

Nossa intenção com a realização desse trabalho foi desenvolver um método de genotipagem de *Yersinia* spp. baseado em HRMA para diferenciação de SNPs presentes nas sequências dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* nas espécies *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei*, bem como aplicar essa metodologia já otimizada para a genotipagem de 40 linhagens de *Y. pseudotuberculosis* dos bio-sorogrupos 1/O:1 e 2/O:3 isoladas no Brasil e, também, para a genotipagem de 50 linhagens de *Y. enterocolitica* pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 provenientes do Brasil, Chile, Estados Unidos, Colômbia e Suécia. Com o decorrer do trabalho percebeu-se a existência de uma região específica no gene 16S rRNA que poderia ser utilizada para a diferenciação por HRMA das espécies *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* que são espécies comprovadamente enteropatogênicas de *Yersinia* e, decidiu-se então otimizar e aplicar a técnica de HRMA também para essa finalidade.

Foi demonstrado nesse estudo que existem, com algumas exceções, SNPs passíveis de serem diferenciados por HRMA em pelo menos um dos fragmentos dos genes aqui estudados (Tabela 17).

As exceções citadas anteriormente referem-se à ausência de SNPs em *Y. pestis* e também ao grande número de SNPs encontrados nos fragmentos dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* em *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. massiliensis*.

Com relação à *Y. pestis*, apesar de terem sido analisadas sequências de diversas linhagens pertencentes a essa espécie, não encontrou-se nenhum SNP nos fragmentos analisados dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA*. Tais resultados condizem com dados da literatura que descrevem *Y. pestis* como uma espécie altamente monomórfica (KOTETISHVILI et al., 2005). Entretanto, em um trabalho publicado por Ciammaruconi et al. (2009) a metodologia de HRMA mostrou-se uma excelente ferramenta para a genotipagem de *Y. pestis*, visto que foi capaz de discriminar corretamente as linhagens estudadas nas suas biovariedades correspondentes. Diferentemente do trabalho aqui idealizado, os autores utilizaram a técnica de HRMA para a diferenciação de *variable number tandem repeats* (VNTR) *regions* que, naturalmente, são mais variáveis que a sequência dos genes utilizados nesse estudo.

Por sua vez, as espécies *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* tem sido descritas como espécies muito heterogêneas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; SULAKVELIDZE, 2000). Alguns trabalhos referem-se à possibilidade de *Y. frederiksenii* ser, na verdade, mais de uma espécie de *Yersinia* cujos representantes não puderam ser separados em função da baixa capacidade de discriminação dos testes fenotípicos utilizados no momento da descrição da espécie (DEMARTA et al., 2004; DOLINA; PEDUZZI, 1993). Essa grande heterogeneidade genômica característica dessas duas espécies pode explicar o grande número de SNPs

encontrados nas sequências analisadas, o que impossibilitou a determinação de SNPs que pudessem ser diferenciados por HRMA nessas espécies de *Yersinia*.

No caso de *Y. massiliensis* por ser uma espécie descrita a pouco tempo (MERHEJ et al., 2008) e com pouca relevância para a saúde humana (SOUZA; FALCÃO, 2012b) não se dispõe na literatura de dados genotípicos substanciais sobre essa espécie. Acredita-se que com mais estudos moleculares a diversidade genotípica de *Y. massiliensis* seja melhor entendida o que pode permitir sua genotipagem por HRMA futuramente. Para se ter uma ideia da problemática envolvendo a diversidade genotípica de *Y. massiliensis*, em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (trabalho enviado para publicação) algumas linhagens fenotipicamente classificadas com *Y. frederiksenii* são, genotipicamente, mais similares à *Y. massiliensis*.

Ao analisarem-se os fragmentos gênicos da espécie *Y. ruckeri* foram encontrados dois SNPs no gene *gyrB*. Uma possível explicação para esse fato é que a utilização de quinolonas como antibioticoterapia para o tratamento de “doença da boca vermelha” pode ter exercido pressão seletiva sobre linhagens de *Y. ruckeri*, levando a uma maior variedade de sequências no gene *gyrB*. Entretanto, a alteração dos dois nucleotídeos encontrados no fragmento do gene *gyrB* leva a alteração apenas de uma valina por uma metionina na proteína codificada por esse gene. Essa alteração de valina por metionina pode não alterar a função biológica da enzima codificada pelo gene *gyrB*, quando analisa-se apenas a região do gene aqui estudada, uma vez que a alteração foi de um aminoácido apolar por outro aminoácido apolar.

Especificamente em relação às linhagens de *Y. pseudotuberculosis* isoladas no Brasil e genotipadas por HRMA (Tabela 10), foram encontrados diferenças de nucleotídeos nos fragmentos 16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP2, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3 e *recA*-SNP2, como pode ser observado na Tabela 32. Os fragmentos *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP4 e *recA*-SNP1 não apresentaram diferenças de nucleotídeos entre as 40 linhagens de *Y.*

pseudotuberculosis analisadas (Tabela 32). Tais resultados estão de acordo com os dados do sequenciamento previamente obtidos para as seis linhagens de *Y. pseudotuberculosis* isoladas no Brasil listadas na Tabela 9 (Yp5, Yp22, Yp30, Yp31, Yp43 e Yp104), que apresentaram sequências bio-sorogrupo específicas no caso das cinco primeiras regiões (16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP2, *gyrB*-SNP1-2, *gyrB*-SNP3 e *recA*-SNP2) e sequências idênticas nos fragmentos *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP3, *gyrB*-SNP4 e *recA*-SNP1.

Os dados de genotipagem de *Y. pseudotuberculosis* por HRMA aqui encontrados (Tabela 32 e Figura 53) e publicados por Souza et. al (2012) somado aos dados epidemiológicos referentes a essas linhagens já publicados (FALCÃO et al., 2008) fornecem evidências moleculares da alta similaridade genômica entre as linhagens de *Y. pseudotuberculosis* isoladas no Brasil. Ao comparar-se o resultado da genotipagem por HRMA das linhagens de *Y. pseudotuberculosis* aqui obtido com o resultado da genotipagem dessas mesmas linhagens por *multilocus sequence typing* (MLST), *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) PCR e *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) realizado pelo nosso grupo (trabalho enviado para publicação) verifica-se que a tipagem molecular por HRMA e por MLST apresentam uma clusterização idêntica. Tanto na genotipagem baseada em HRMA quanto na genotipagem baseada em MLST, os bio-sorogrupos 1/O:1 e 2/O:3 de *Y. pseudotuberculosis* foram agrupados separadamente e com 100% de similaridade entre as linhagens constituintes de cada grupo. As técnicas de ERIC-PCR e PFGE também agruparam essas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* em *clusters* bio-sorogrupo específicos, entretanto elas apresentam uma capacidade de diferenciação maior entre as linhagens pertencentes a um mesmo *cluster* quando comparadas ao HRMA e ao MLST (dados enviados para publicação).

Um dado interessante que se deve relatar é que ao analisar-se o agrupamento das linhagens de *Y. pseudotuberculosis* isoladas no Brasil obtido com a técnica de HRMA aqui proposta frente aos dados de marcadores de virulência dessas mesmas linhagens publicados

por Martins et al. (2007), foi possível identificar distintos potenciais patogênicos entre os dois grupos formados. Somente as linhagens do bio-sorogrupo 1/O:1 e agrupadas no *cluster* denominado “A” na Figura 53 possuem marcadores de virulência encontrados na ilha de alta patogenicidade e relacionados ao sistema de captura de ferro (SOUZA; FALCÃO, 2012a).

No caso das linhagens de *Y. enterocolitica* genotipadas por HRMA, foram encontrados diferenças de nucleotídeos em todos os fragmentos analisados (16S rRNA-SNP1, *glnA*-SNP1, *glnA*-SNP2-3, *glnA*-SNP4, *hsp60*-SNP1, *hsp60*-SNP2-3 e *hsp60*-SNP4-5), como pode ser observado na Tabela 33.

Os dados obtidos com a genotipagem de *Y. enterocolitica* por HRMA foram consistentes com o perfil patogênico dos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica*, uma vez que três grupos distintos foram identificados. O primeiro deles foi formado por linhagens do biotipo 1B que são consideradas linhagens altamente patogênicas, o segundo, foi composto pelas linhagens dos biotipos 2, 3, 4 e 5 que são caracterizadas como linhagens de patogenicidade moderada e o terceiro, foi formado pelas linhagens pertencente ao biotipo 1A que é descrito, sobretudo, como um biotipo não patogênico de *Yersinia*.

Dessa maneira, pode-se dizer que a técnica de HRMA baseada na análise da sequência de diversos *loci* tem potencial para ser utilizada na genotipagem de linhagens de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* visto que é capaz de diferenciar em distintos perfis de *melting* os alelos que apresentam diferenças na sequência de nucleotídeos. Ademais, a técnica de HRMA conseguiu agrupar as linhagens pertencentes a essas duas espécies de *Yersinia* em *clusters* relacionados ao perfil patogênico de cada espécie em separado.

No caso das espécies *Y. bercovieri*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei* o pequeno número de linhagens analisadas por HRMA não permitiu o estabelecimento de nenhuma informação epidemiológica relevante como no caso de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Entretanto, tal fato não minimiza a importância da técnica de HRMA para a genotipagem de

linhagens pertencentes a essas espécies de *Yersinia*. A utilização de um número maior de linhagens de cada uma dessas espécies poderá fornecer informações epidemiológicas valiosas que não foram reveladas nesse estudo pelo pequeno número de linhagens utilizadas.

As espécies *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri* apresentaram, respectivamente, apenas um e dois SNPs diferenciáveis por HRMA. Diante desse fato, pode-se inferir que a genotipagem dessas duas espécies de *Yersinia* baseada na identificação de SNPs por HRMA nos fragmentos dos genes 16S rRNA, *glnA*, *gyrB*, *hsp60* e *recA* não é uma metodologia indicada.

Além das informações epidemiológicas geradas com a genotipagem de *Yersinia* spp. por HRMA esse trabalho também objetivou a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* por HRMA. O intuito da utilização dessa técnica para diferenciação entre essas duas espécies justifica-se pelas diferenças encontradas no perfil de resistência a antibióticos nessas duas espécies de *Yersinia*.

Apesar da maioria dos casos de gastroenterite causada por *Y. pseudotuberculosis* ou *Y. enterocolitica* não necessitar de tratamento, nos casos de septicemia, especialmente em pacientes imunocomprometidos, o tratamento com antibióticos faz-se necessário. Nesses casos, o tratamento de septicemia causada por *Y. pseudotuberculosis* deve ser baseado na administração de ampicilina, estreptomicina ou tetraciclina e nos casos de infecção por *Y. enterocolitica*, sulfametoxazol+trimetoprima ou fluoroquinolonas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Dessa maneira, uma diferenciação rápida entre *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que pode ser realizada por HRMA (Figura 56), tem um papel importante para a escolha da antibioticoterapia mais adequada. Entretanto, deve-se atentar para novos relatos de resistência nessas duas espécies de *Yersinia* (CAPILLA et al., 2004; TERENCEVA; BĚRZINS, 2010).

A qualidade e a concentração do DNA utilizado para a genotipagem de *Yersinia* spp. e para a diferenciação de *Y. pseudotuberculosis* de *Y. enterocolitica* propostas nesse trabalho foram determinantes para a obtenção de perfis de *melting* reprodutíveis. Os experimentos somente foram reprodutíveis com 18-22 ng de DNA por reação. Sob essas condições, a técnica de HRMA forneceu perfis de *melting* intra-experimentos reprodutíveis para o mesmo alelo, o que permitiu a diferenciação de alelos com diferentes SNPs. Apesar dos perfis de *melting* terem sido reprodutíveis para um mesmo alelo, as curvas de *melting* nem sempre se sobrepuseram perfeitamente.

Apesar de a genotipagem baseada em HRMA já ter sido aplicada para a genotipagem de diversos patógenos, ainda persistem algumas dúvidas a respeito do tamanho do *amplicon* considerado ideal para genotipagem por HRMA. Geralmente é aceito que a diferenciação entre genótipos é mais fácil quando os *amplicons* são pequenos. Um *amplicon* menor que 300 pb apresenta especificidade e sensibilidade ideais para HRMA (GUNDRY et al., 2008; LIEW et al., 2004; RICHARDSON et al., 2011). Como se pode observar nesse estudo, os pares de *primers* foram construídos de modo a gerarem *amplicons* com no máximo 300 pb a fim de facilitar a diferenciação dos SNPs por HRMA. Entretanto, trabalhos utilizando *amplicons* maiores que 300 pb também foram eficientes para a genotipagem de micro-organismos por HRMA (CIAMMARUCONI et al., 2009; MERCHANT-PATEL et al., 2010).

Embora o sequenciamento seja considerado o padrão-ouro para a detecção de mutações (VAN DER STOEP et al., 2009), o sequenciamento sistemático de todas as amostras pelo método de Sanger torna-se caro e demorado (SEVILLA et al., 2002). Embora as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) possam aumentar o número de amostras sequenciadas, elas ainda são uma alternativa cara e não realista para alguns laboratórios (SCHUSTER, 2008). Dessa maneira, métodos rápidos e custo-efetivos para

investigações epidemiológicas são necessários, particularmente para estudos populacionais de micro-organismos em países em desenvolvimento.

Obviamente, um sistema de genotipagem baseado na análise de perfis de *melting* de alta resolução não substitui os métodos de genotipagem baseados em sequenciamento. Caso seja encontrado um perfil de *melting* não identificado, o sequenciamento torna-se necessário. Entretanto, uma vez caracterizado tal perfil de *melting*, ele pode ser utilizado como referência em subsequentes análises por HRMA. Dessa maneira, embora a técnica de HRMA não substitua os métodos de genotipagem baseados em sequenciamento, essa nova metodologia pode complementá-los (LÉVESQUE et al., 2011). Adicionalmente, pelo fato da técnica de HRMA ser um método não destrutivo, os *amplicons* gerados podem ser usados diretamente para o sequenciamento, uma vez que o *dye* não introduz qualquer tipo de interferência no sequenciamento (SLANY et al., 2010; VOSSEN et al., 2009).

A estratégia para a genotipagem de micro-organismos baseada em HRMA apresenta muitas vantagens, mas seu maior benefício é a redução no custo e tempo de análise quando comparada às técnicas que utilizam sequências de nucleotídeos. A técnica de HRMA necessita apenas de um reagente genérico (agente saturante intercalante de dsDNA) para todos os experimentos de genotipagem e é realizada em um sistema fechado, o que evita o alto custo associado à síntese de sondas marcadas e os riscos associados à contaminação cruzada (GUNDRY et al., 2008; ONG et al., 2010). Ademais, todo o processo de análise baseado em HRMA, incluindo a etapa de qPCR, a obtenção das curvas de *melting* e a análise dos perfis de *melting*, pode ser realizado em aproximadamente 3 horas e sua sensibilidade e especificidade são comparadas a de outras técnicas disponíveis (MERCHANT-PATEL et al., 2010; REED; WITTEWER, 2004). Finalmente, a genotipagem baseada na técnica de HRMA não requer análise de géis de agarose, sequenciamento ou análise de sequências para a caracterização do SNP presente (LÉVESQUE et al., 2011).

Como reportado por Stephens et al. (2008), os dados produzidos por HRMA são portáteis e podem ser usados para a construção de bancos de dados. Por isso, os resultados obtidos podem facilitar uma cooperação internacional objetivando o entendimento da genética e da biodiversidade de diversos micro-organismos.

Diante das características inerentes à técnica de HRMA, pode-se afirmar que essa metodologia de análise tem o potencial de complementar os métodos de tipagem molecular baseados em sequenciamento e facilitar uma ampla variedade de estudos de genotipagem, patogenicidade, ecologia, epidemiologia e resistência dentro do gênero *Yersinia*.

7. Conclusões

“Não há fatos eternos,
como não há verdades absolutas”
(Friedrich Nietzsche)

7. CONCLUSÕES

- 7.1.** A técnica baseada em HRMA desenvolvida nesse trabalho comprovou-se eficiente para a genotipagem de linhagens pertencentes às espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, bem como apresentou potencial para ser utilizada na genotipagem de linhagens pertencentes às espécies *Y. bercovieri*, *Y. intermedia* e *Y. rohdei*. Entretanto, não mostrou ser uma metodologia indicada para a genotipagem de linhagens pertencentes às espécies *Y. pestis*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii* e *Y. ruckeri*.
- 7.2.** A técnica baseada em HRMA desenvolvida foi eficiente para genotipar *Y. pseudotuberculosis*, visto que conseguiu agrupar as 40 linhagens estudadas em grupos bio-sorogrupos específicos relacionados ao potencial patogênico das linhagens pertencentes a essa espécie de *Yersinia*.
- 7.3.** A técnica baseada em HRMA desenvolvida eficiente para genotipar *Y. enterocolitica*, uma vez que conseguiu agrupar as 50 linhagens estudadas em grupos relacionados aos perfis de patogenicidade característicos dos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica*.
- 7.4.** A técnica baseada em HRMA desenvolvida mostrou-se eficiente para a diferenciação rápida de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, o que pode contribuir para a escolha da antibioticoterapia mais adequada para o tratamento das infecções sistêmicas ocasionadas por cada uma das espécies.

8. Referências bibliográficas¹

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M., ZURTH, K., MORELLI, G., TORREA, G., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 96, p. 14043-14048, 1999.

AJITKUMAR, P., BARKEMA, H.W., DE BUCK, J. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 155, p. 332-340, 2012.

AJITKUMAR, P., BARKEMA, H.W., ZADOKS, R.N., MORCK, D.W., VAN DER MEER, F.J., DE BUCK, J. High-resolution melt analysis for species identification of coagulase-negative staphylococci derived from bovine milk. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 75, p. 227-234, 2013.

ALEKSIC, S., STEIGERWALT, A.G., BOCKEMÜHL, J., HUNTLEY-CARTER, G.P., BRENNER, D.J. *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 37, p. 327-332, 1987.

ARANCIA, S., SANDINI, S., DE BERNARDIS, F., FORTINI, D. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 283-285, 2011.

BASTARDO, A., RAVELO, C., ROMALDE, J.L. Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 1888-1897, 2012.

BERCOVIER, H., URSING, J., BRENNER, D.J., STEIGERWALT, A.G., FANNING, G.R., CARTER, G.P., MOLLARRET, H.H. *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* compose of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 219-224, 1980.

BERCOVIER, H., STEIGERWALT, A.G., GUIYOULE, A., HUNTLEY-CARTER, G., BRENNER, D.J. *Yersinia aldovae* (formely *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 34, p. 166-172, 1984.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 257-276, 1997.

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

BRENNER, D.J., BERCOVIER, H., URSING, J., ALONSO, J.M., STEIGERWALT, A.G., FANNING, G.R., CARTER, G.P., MOLLARET, H.H. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose positive, raffinose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica* like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 207-212, 1980.

BRENNER, D.J., STEIGERWALT, A.G., FALCÃO, D.P., WEAVER, R.E., FANNING, G.R. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 26, p. 180-194, 1976.

BRITO, P.H., EDWARDS, S.V. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetica**, v. 135, p. 439-455, 2009.

BRUMFIELD, R., BEERLI, P., NICKERSON, D., EDWARDS, S. The utility of single-nucleotide polymorphisms in inference of population history. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, p. 249-256, 2003.

BUTLER, T. Plague into the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 736-742, 2009.

CAPILLA, S., RUIZ, J., GOÑI, P., CASTILLO, J., RUBIO, M.C., JIMÉNEZ DE ANTA, M.T., GÓMEZ-LUS, R., VILA, J. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1068-1071, 2004.

CARNIEL, E. Chromosomal virulence factors of *Yersinia*: an update. **Contributions to Microbiology & Immunology**, v. 13, p. 218-224, 1995.

CARNIEL, E. Evolution of pathogenic *Yersinia*, some lights in the dark. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 529, p. 3-12, 2003.

CH'NG, S.L., OCTAVIA, S., XIA, Q., DUONG, A., TANAKA, M.M., FUKUSHIMA, H., LAN, R. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 768-775, 2011.

CHENG, J.C., HUANG, C.L., LIN, C.C., CHEN, C.C., CHANG, Y.C., CHANG, S.S., TSENG, C.P. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 1997-2004, 2006.

CHO, M.H., CIULLA, D., KLANDERMAN, B.J., RABY, B.A., SILVERMAN, E.K. High-resolution melting curve analysis of genomic and whole-genome amplified DNA. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 2055-2058, 2008.

CHOI, G.E., LEE, S.M., YI, J., HWANG, S.H., KIM, H.H., LEE, E.Y., CHO, E.H., KIM, J.H., KIM, H.J., CHANG, C.L. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3893-3898, 2010.

CIAMMARUCONI, A., GRASSI, S., FAGGIONI, G., DE SANTIS, R., PITTIGLIO, V., D'AMELIO, R., VERGNAUD, G., LISTA, F. A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, p. 7-13, 2009.

COOPER, J.E., FEIL, E.J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 373-377, 2004.

CORNELIS, G.R. The *Yersinia* deadly kiss. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5495-5504, 1998.

CORNELIS, G.R. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 742-752, 2002.

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, p. 1315-1352, 1998.

DE BOER, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. **Contributions to Microbiology & Immunology**, v. 13, p. 71-73, 1995.

DE KONING-WARD, T.F., ROBINS-BROWNE, R.M. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3790-3795, 1995.

DEMARTA, A., DE RESPINIS, S., DOLINA, M., PEDUZZI, R. Molecular typing of *Yersinia frederiksenii* strains by means of 16s rDNA and *gyrB* genes sequence analyses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 423-428, 2004.

DOLINA, M., PEDUZZI, R. Population genetics of human, animal, environmental *Yersinia* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2, p. 442-450, 1993.

DRUMMOND, N., MURPHY, B.P., RINGWOOD, T., PRENTICE, M.B., BUCKLEY, J.F., FANNING, S. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 9, p. 179-189, 2012.

EL TAHIR, Y., KUUSELA, P., SKURNIK, M. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG-S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 192-206, 2000.

EL TAHIR, Y., SKURNIK, M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 209-218, 2001.

ERALI, M., VOELKERDING, K.V., WITTEWER, C.T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 50-58, 2008.

ERALI, M., WITTEWER, C.T. High resolution melting analysis for gene scanning. **Methods**, v. 50, p. 250-261, 2010.

EWING, W.H., ROSS, A.J., BRENNER, D.J., FANNING, G.R. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 37-44, 1978.

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, p. 1-16, 2008.

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

FORTINI, D., CIAMMARUCONI, A., DE SANTIS, R., FASANELLA, A., BATTISTI, A., D'AMELIO, R., LISTA, F., CASSONE, A., CARATTOLI, A. Optimization of high-resolution melting analysis for low-cost and rapid screening of allelic variants of *Bacillus anthracis* by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1377-1380, 2007.

FOUZ, B., ZARZA, C., AMARO, C. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 339-346, 2006.

FOXMAN, B., ZHANG, L., KOOPMAN, J.S., MANNING, S.D., MARRS, C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v. 2, p. 10, 2005.

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

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, In: SIMJEE, S. (Ed.). **Infectious Disease: Foodborne Diseases**. Totowa, N.J.: Humana Press, cap. 4, p. 79-113, 2007.

FUKUSHIMA, H. Molecular epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 529, p. 357-358, 2003.

FUKUSHIMA, H., MATSUDA, Y., SEKI, R., TSUBOKURA, M., TAKEDA, N., SHUBIN, F.N., PAIK, I.K., ZHENG, X.B. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3541-3547, 2001.

GARRITANO, S., GEMIGNANI, F., VOEGELE, C., NGUYEN-DUMONT, T., LE CALVEZ-KELM, F., DE SILVA, D., LESUEUR, F., LANDI, S., TAVTIGIAN, S.V. Determining the effectiveness of high resolution melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. **BMC Genetics**, v. 10, p. 5, 2009.

GORI, A., CERBONESCHI, M., TEGLI, S. High-resolution melting analysis as a powerful tool to discriminate and genotype *Pseudomonas savastanoi* pathovars and strains. **PLoS One**, v. 7, p. e30199, 2012.

GRAHAM, R., LIEW, M., MEADOWS, C., LYON, E., WITTEWER, C.T. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 1295-1298, 2005.

GREENWOOD, M.H., HOOPER, W.L., RODHOUSE, J.C. The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a dairy. **Epidemiology and Infection**, v. 104, p. 351-360, 1990.

GUIYOULE, A., RASOAMANANA, B., BUCHRIESER, C., MICHEL, P., CHANTEAU, S., CARNIEL, E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2826-2833, 1997.

GUNDRY, C.N., DOBROWOLSKI, S.F., MARTIN, Y.R., ROBBINS, T.C., NAY, L.M., BOYD, N., COYNE, T., WALL, M.D., WITTEWER, C.T., TENG, D.H. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 3401-3408, 2008.

HARDICK, J., WON, H., JENG, K., HSIEH, Y.H., GAYDOS, C.A., ROTHMAN, R.E., YANG, S. Identification of bacterial pathogens in ascitic fluids from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis by use of broad-range PCR (16S PCR) coupled with high-resolution melt analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 2428-2432, 2012.

HARPENDING, H.C., BATZER, M.A., GURVEN, M., JORDE, L.B., ROGERS, A.R., SHERRY, S.T. Genetic traces of ancient demography. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 1961-1967, 1998.

HOFINGER, B.J., JING, H.C., HAMMOND-KOSACK, K.E., KANYUKA, K. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 851-865, 2009.

HOMMAIS, F., PEREIRA, S., ACQUAVIVA, C., ESCOBAR-PÁRAMO, P., DENAMUR, E. Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4784-4792, 2005.

HOSAKA, S., UCHIYAMA, M., ISHIKAWA, M., AKAHOSHI, T., KONDO, H., SHIMAUCHI, C., SASAHARA, T., INOUE, M. *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 septicemia in an otherwise healthy adult: analysis of chromosome DNA pattern by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 3346-3347, 1997.

HUNG, C.C., LEE, C.N., CHANG, C.H., JONG, Y.J., CHEN, C.P., HSIEH, W.S., SU, Y.N., LIN, W.L. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 162-166, 2008.

HURST, M.R., BECHER, S.A., YOUNG, S.D., NELSON, T.L., GLARE, T.R. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 844-849, 2011.

ICHINOHE, H., YOSHIOKA, M., FUKUSHIMA, H., KANEKO, S., MARUYAMA, T. First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 846-847, 1991.

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

ISBERG, R.R., BARNES, P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 21-28, 2001.

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

JEFFERY, N., GASSER, R.B., STEER, P.A., NOORMOHAMMADI, A.H. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. **Microbiology**, v. 153, p. 2679-2688, 2007.

JENG, K., GAYDOS, C.A., BLYN, L.B., YANG, S., WON, H., MATTHEWS, H., TOLENO, D., HSIEH, Y.H., CARROLL, K.C., HARDICK, J., MASEK, B., KECOJEVIC, A., SAMPATH, R., PETERSON, S., ROTHMAN, R.E. Comparative analysis of two broad-range PCR assays for pathogen detection in positive-blood-culture bottles: PCR-high-resolution melting analysis versus PCR-mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 3287-3292, 2012.

KAPABIOSYSTEMS. Introduction to high resolution melting analysis. Disponível em: <http://www.kapabiosystems.com/public/pdfs/kapa-hrm-fast-pcr-kits/Introduction_to_High_Resolution_Melt_Analysis_Guide.pdf>. Acesso em: 1º de Março de 2013.

KIM, W., SONG, M.O., SONG, W., KIM, K.J., CHUNG, S.I., CHOI, C.S., PARK, Y.H. Comparison of 16S rDNA analysis and rep-PCR genomic fingerprinting for molecular identification of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 83, p. 125-133, 2003.

KOORNHOF, H.J., SMEGO, R.A., NICOL, M. Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, p. 87-112, 1999.

KOTETISHVILI, M., KREGER, A., WAUTERS, G., MORRIS, J.G., SULAKVELIDZE, A., STINE, O.C. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2674-2684, 2005.

LAUKKANEN-NINIOS, R., DIDELOT, X., JOLLEY, K.A., MORELLI, G., SANGAL, V., KRISTO, P., BREHONY, C., IMORI, P.F.M., FUKUSHIMA, H., SIITONEN, A., TSENEVA, G., VOSKRESSENSKAYA, E., FALCÃO, J.P., KORKEALA, H., MAIDEN, M.C., MAZZONI, C., CARNIEL, E., SKURNIK, M., ACHTMAN, M. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 3114-3127, 2011.

LÉVESQUE, S., MICHAUD, S., ARBEIT, R.D., FROST, E.H. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. **PLoS One**, v. 6, p. e16167, 2011.

LIEW, M., PRYOR, R., PALAIS, R., MEADOWS, C., ERALI, M., LYON, E., WITTWER, C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1156-1164, 2004.

MAIDEN, M.C., BYGRAVES, J.A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J.E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D.A., FEAVERS, I.M., ACHTMAN, M., SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MARTIN, L., LECLERCQ, A., SAVIN, C., CARNIEL, E. Characterization of atypical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2377-2380, 2009.

MARTINS, C.H., BAUAB, T.M., LEITE, C.Q., FALCÃO, D.P. Ribotyping and virulence markers of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 587-592, 2007.

MARTÍNEZ, P.O., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., SOKOLOVA, Y., ROASTO, M., BERZINS, A., KORKEALA, H. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 6, p. 719-724, 2009.

MARUYAMA, T. *Yersinia enterocolitica* infection in humans and isolation of the microorganism from pigs in Japan. **Contributions to Microbiology & Immunology**, v. 9, p. 48-55, 1987.

MERCHANT-PATEL, S., BLACKALL, P.J., TEMPLETON, J., PRICE, E.P., TONG, S.Y., HUYGENS, F., GIFFARD, P.M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 493-499, 2010.

MERHEJ, V., ADÉKAMBI, T., PAGNIER, I., RAOULT, D., DRANCOURT, M. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 779-784, 2008.

MIGNARD, S., FLANDROIS, J.P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574-581, 2006.

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

MONTGOMERY, J., WITTWER, C.T., PALAIS, R., ZHOU, L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. **Nature Protocols**, v. 2, p. 59-66, 2007.

MORIN, P., LUIKART, G., WAYNE, R., ALLENDORF, F., AQUARDO, C., AXELSSON, T., BEAUMONT, M., CHAMBERS, K., DURSTEWITZ, G., MITCHELL-OLDS, T., PALSBOLE, P., POINAR, H., PRZEWORSKI, M., TAYLOR, B., WAKELEY, J. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, p. 208-216, 2004.

MORIN, P.A., MARTIEN, K.K., TAYLOR, B.L. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 66-73, 2009.

MURROS-KONTIAINEN, A., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORKEALA, H., JOHANSSON, P., RAHKILA, R., BJÖRKROTH, J. *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2368-2372, 2011a.

MURROS-KONTIAINEN, A., JOHANSSON, P., NISKANEN, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORKEALA, H., BJÖRKROTH, J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2363-2367, 2011b.

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. **Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique**, v. 24, p. 479-496, 1976.

NOVOSLAVSKIJ, A., SERNIENĖ, L., MALAKAUSKAS, A., LAUKKANEN-NINIOS, R., KORKEALA, H., MALAKAUSKAS, M. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at farms and slaughter in Lithuania. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 209-213, 2013.

OCTAVIA, S., LAN, R. Single-nucleotide-polymorphism typing and genetic relationships of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3795-3801, 2007.

OKWORI, A.E., MARTÍNEZ, P.O., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., AGINA, S.E., KORKEALA, H. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O:9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O:1 strains isolated from human and non-human sources in the Plateau State of Nigeria. **Food Microbiology**, v. 26, p. 872-875, 2009.

OLIVE, D.M., BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

ONG, D.C., YAM, W.C., SIU, G.K., LEE, A.S. Rapid detection of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by high-resolution melting analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1047-1054, 2010.

PERNG, C.L., CHEN, H.Y., CHIUEH, T.S., WANG, W.Y., HUANG, C.T., SUN, J.R. Identification of non-tuberculous mycobacteria by real-time PCR coupled with a high-resolution melting system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, p. 944-951, 2012.

PERRY, R.D., FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 35-66, 1997.

RAKIN, A., NOELTING, C., SCHUBERT, S., HEESEMANN, J. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5265-5274, 1999.

REED, G.H., KENT, J.O., WITTWER, C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, p. 597-608, 2007.

REED, G.H., WITTWER, C.T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1748-1754, 2004.

RICHARDSON, L.J., TONG, S.Y., TOWERS, R.J., HUYGENS, F., MCGREGOR, K., FAGAN, P.K., CURRIE, B.J., CARAPETIS, J.R., GIFFARD, P.M. Preliminary validation of a novel high-resolution melt-based typing method based on the multilocus sequence typing scheme of *Streptococcus pyogenes*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1426-1434, 2011.

ROBINS-BROWNE, R.M. *Yersinia enterocolitica*, In: DOYLE, P.M., BEUCHAT, L.R., MOTVILLE, T.J. (Eds.). **Food Microbiology**. Boca Raton: ASM Press, p. 215-245, 2001.

ROLLINS, S.E., ROLLINS, S.M., RYAN, E.T. *Yersinia pestis* and the plague. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 119, p. 78-85, 2003.

RUSKOVA, L., RACLAVSKY, V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**, v. 155, p. 239-252, 2011.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Spectrophotometry of DNA or RNA, In: SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. (Eds.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. A8.20-A28.21, 2001.

SANSONETTI, P.J. War and peace at mucosal surfaces. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 953-964, 2004.

SCHLEIFSTEIN, J., COLEMAN, M.B. An unidentified microorganism resembling *Bacillus lignieri* e *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. **New York State Journal of Medicine**, v. 39, p. 1749-1753, 1939.

SCHRIEFER, M.E., PETERSEN, J.M. *Yersinia*, In: VERSALOVIC, J., CARROLL, K.C., FUNKE, G., JORGENSEN, J.H., LANDRY, M.L., WARNOCK, D.W. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C.: ASM Press, p. 627-638, 2011.

SCHUSTER, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, v. 5, p. 16-18, 2008.

SCOTT, J.C., KOYLASS, M.S., STUBBERFIELD, M.R., WHATMORE, A.M. Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7331-7337, 2007.

SEALE, R.B., DHAKAL, R., CHAUHAN, K., CRAVEN, H.M., DEETH, H.C., PILLIDGE, C.J., POWELL, I.B., TURNER, M.S. Genotyping of present-day and historical *Geobacillus* species isolates from milk powders by high-resolution melt analysis of multiple variable-number tandem-repeat loci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7090-7097, 2012.

SEVILLA, C., MOATTI, J.P., JULIAN-REYNIER, C., EISINGER, F., STOPPA-LYONNET, D., BRESSAC-DE PAILLERETS, B., SOBOL, H. Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, p. 599-606, 2002.

SKURNIK, M., BENGOCHEA, J.A. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia* spp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2521-2529, 2003.

SLANY, M., VANERKOVA, M., NEMCOVA, E., ZALOUDIKOVA, B., RUZICKA, F., FREIBERGER, T. Differentiation of *Staphylococcus* spp. by high-resolution melting analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 1040-1049, 2010.

SLINGER, R., BELLFOY, D., DESJARDINS, M., CHAN, F. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 455-458, 2007.

SMITH, B.L., LU, C.P., ALVARADO BREMER, J.R. Methodological streamlining of SNP discovery and genotyping via high-resolution melting analysis (HRMA) in non-model species. **Marine Genomics**, v. 9, p. 39-49, 2013.

SMITH, B.L., LU, C.P., ALVARADO BREMER, J.R. High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 193-196, 2010.

SMITH, J.E., THAL, E. A taxonomic study of the genus *Pasteurella* using numerical technique. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 213-223, 1965.

SOUZA, R.A., FALCÃO, D.P., FALCÃO, J.P. Emended description of *Yersinia massiliensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 1094-1097, 2011.

SOUZA, R.A., FALCÃO, J.P. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 329-335, 2012a.

SOUZA, R.A., FALCÃO, J.P. Pathogenic potential of the *Yersinia massiliensis* species. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 954, p. 223-228, 2012b.

SOUZA, R.A., PITONDO-SILVA, A., FALCÃO, D.P., FALCÃO, J.P. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 141-150, 2010.

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

SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H.C., AMANN, S., BUSSE, H.J., NEUBAUER, H. *Yersinia similis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 952-958, 2008.

STENSETH, N.C., ATSHABAR, B.B., BEGON, M., BELMAIN, S.R., BERTHERAT, E., CARNIEL, E., GAGE, K.L., LEIRS, H., RAHALISON, L. Plague: past, present, and future. **PLoS Medicine**, v. 5, p. e3, 2008.

STEPHENS, A.J., INMAN-BAMBER, J., GIFFARD, P.M., HUYGENS, F. High-resolution melting analysis of the spa repeat region of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 432-436, 2008.

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

TAYLOR, C.F. Mutation scanning using high-resolution melting. **Biochemical Society Transaction**, v. 37, p. 433-437, 2009.

TERENTJEVA, M., BĒRZINS, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in slaughter pigs in Latvia. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1335-1338, 2010.

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, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v. 13: 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: 230-235, 1982b.

TSUBOKURA, M., ALEKSIĆ, S. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera. **Contributions to Microbiology & Immunology**, v. 13, p. 99-105, 1995.

TWIN, J., JENSEN, J.S., BRADSHAW, C.S., GARLAND, S.M., FAIRLEY, C.K., MIN, L.Y., TABRIZI, S.N. Transmission and selection of macrolide resistant *Mycoplasma genitalium* infections detected by rapid high resolution melt analysis. **PLoS One**, v. 7, p. e35593, 2012.

URSING, J., BRENNER, D.J., BERCOVIER, H., FANNING, G.R., STEIGERWALT, A.G., BRAULT, J., H.H., M. *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 DER STOEP, N., VAN PARIDON, C.D., JANSSENS, T., KRENKOVA, P., STAMBERGOVA, A., MACEK, M., MATTHIJS, G., BAKKER, E. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner. **Human Mutation**, v. 30, p. 899-909, 2009.

VAN LOGHEM, J.J. The classification of the plague-bacillus. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 10, p. 15-16, 1944.

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

VOSSSEN, R.H., ATEN, E., ROOS, A., DEN DUNNEN, J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. **Human Mutation**, v. 30, p. 860-866, 2009.

WANG, F., SHEN, H., GUAN, M., WANG, Y., FENG, Y., WENG, X., WANG, H., ZHANG, W. High-resolution melting facilitates mutation screening of *rpsL* gene associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiological Research**, v. 166, p. 121-128, 2011.

WARTH, J.F., BIESDORF, S.M., DE SOUZA, C. *Yersinia pseudotuberculosis* O III causes diarrhea in Brazilian cattle. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 954, p. 107-110, 2012.

WAUTERS, G., ALEKSIĆ, S., CHARLIER, J., SCHULZE, G. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. **Contributions to Microbiology & Immunology**, v. 12, p. 239-243, 1991.

WAUTERS, G., JANSSENS, M., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J. *Yersinia mollareti* sp., nov. and *Y. bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A e 3B. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 424-429, 1988.

WOJCIECH, Ł., STARONIEWICZ, Z., JAKUBCZAK, A., UGORSKI, M. Typing of *Yersinia enterocolitica* isolates by ITS profiling, REP- and ERIC-PCR. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, p. 238-244, 2004.

WU, S.B., WIRTHENSOHN, M.G., HUNT, P., GIBSON, J.P., SEDGLEY, M. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 1-14, 2008.

ZENG, T.T., YE, Y.X., NIU, Q., LU, X.J., AN, Y.F., LI, X.P., JIANG, H. Frequency distribution of single nucleotide polymorphisms in P-selection gene in chinese tibetan and han populations. **Gene**, v. 449, p. 352-356, 2012.

ZHOU, D., TONG, Z., SONG, Y., HAN, Y., PEI, D., PANG, X., ZHAI, J., LI, M., CUI, B., QI, Z., JIN, L., DAI, R., DU, Z., WANG, J., GUO, Z., HUANG, P., YANG, R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5147-5152, 2004.

9. Apêndices

Apêndice I – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a verificação da pureza das linhagens representativas de *Yersinia* spp. estudadas, com exceção das duas linhagens de *Y. pestis*

Linhagens	Mac Conkey	TSI			EPM				MILi			Citrato de Simmons
		Pico/base	Gás	H ₂ S	Gás	H ₂ S	Urease	Triptof. ^a	Motil. ^b	Lisina	Indol	
<i>Y. bercovieri</i> ATCC 43970	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. bercovieri</i> WE 582/87	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. bercovieri</i> IP 7966	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 125	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 153	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 195	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 387	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 483	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 505	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 571	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 587	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 610	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 6883	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7326	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8395	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8396	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> 8081	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 197	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 474	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 106	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 107	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 108	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 112	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 116	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 127	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Continua

Continuação

Linhagens	Mac Conkey	TSI			EPM				MILI			Citrato de Simmons
		Pico/base	Gás	H ₂ S	Gás	H ₂ S	Urease	Triptof. ^a	Motil. ^b	Lisina	Indol	
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 142	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 602	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7661	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7662	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7663	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7664	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7665	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 123	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 327	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 329	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 331	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 352	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 8233	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 76	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 78	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 374	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 380	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 384	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 472	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 600	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 615	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 626	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 3890	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7887	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8016	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8239	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 8232	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Continuação

Linhagens	Mac Conkey	TSI			EPM				MILi			Citrato de Simmons
		Pico/Base	Gás	H ₂ S	Gás	H ₂ S	Urease	Triptof. ^a	Motil. ^b	Lisina	Indol	
<i>Y. frederiksenii</i> ATCC 33641	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 236	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 379	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 412	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 543	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 577	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. intermedia</i> ATCC 29909	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> FCF 297	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> FCF 323	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> FCF 349	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8181	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8184	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8373	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Y. kristensenii</i> ATCC 33638	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 61	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 281	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 326	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 410	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 580	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 604	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i> CCUG 53443	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 216	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 457	Lac +	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 465	Lac +	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 494	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. mollaretii</i> ATCC 43969	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. mollaretii</i> WE 316/84	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Continuação

Linhagens	Mac Conkey	TSI			EPM				MILI			Citrato de Simmons
		Pico/Base	Gás	H ₂ S	Gás	H ₂ S	Urease	Triptof. ^a	Motil. ^b	Lisina	Indol	
<i>Y. mollaretii</i> WA 751	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. mollaretii</i> WE 19/88	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp1	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp2	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp4	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp8	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp10	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp14	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp15	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp21	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp22	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp26	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp28	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp30	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp31	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp32	Lac -	K/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp34	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp35	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp37	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp40	Lac -	K/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp43	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp45	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp46	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp52	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp57	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp61	Lac -	K/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Conclusão

Linhagens	Mac Conkey	TSI			EPM				MILI			Citrato de Simmons
		Pico/Base	Gás	H ₂ S	Gás	H ₂ S	Urease	Triptof. ^a	Motil. ^b	Lisina	Indol	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp67	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp70	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp71	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp75	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp78	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp80	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp84	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp85	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp90	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp94	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp95	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp99	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp100	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp101	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp104	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp105	Lac -	K/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. rohdei</i> ATCC 43380	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. rohdei</i> WA 9/90	Lac -	K/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. rohdei</i> FCF 466	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. rohdei</i> IP 8400	Lac -	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	Lac -	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> FCF 229	Lac -	K/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> FCF 231	Lac -	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a, L-triptofano desaminase; ^b, motilidade

Apêndice II – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a reconfirmação bioquímica das linhagens representativas de *Yersinia* spp. estudadas, com exceção das duas linhagens de *Y. pestis*

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafnose
<i>Y. bercovieri</i> ATCC 43970	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Y. bercovieri</i> WE 582/87	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Y. bercovieri</i> IP 7966	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 125	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 153	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 195	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 387	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 483	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 505	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 571	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 587	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 610	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 6883	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7326	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8395	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8396	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-

Continua

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafínose
<i>Y. enterocolitica</i> 8081	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 197	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 474	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 106	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 107	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 108	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 112	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 116	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 127	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 142	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 602	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7661	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7662	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7663	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7664	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7665	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 123	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 327	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-

Continuação

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafinose
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 329	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 331	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 352	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 8233	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 76	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 78	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 374	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 380	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 384	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 472	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 600	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 615	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF 626	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 3890	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 7887	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8016	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> IP 8239	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> CCUG 8232	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Continua

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafinose
<i>Y. frederiksenii</i> ATCC 33641	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 236	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 379	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 412	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 543	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. frederiksenii</i> FCF 577	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Y. intermedia</i> ATCC 29909	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. intermedia</i> FCF 297	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Y. intermedia</i> FCF 323	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Y. intermedia</i> FCF 349	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8181	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8184	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. intermedia</i> IP 8373	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i> ATCC 33638	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 61	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 281	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 326	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-

Continua

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafnose
<i>Y. kristensenii</i> FCF 410	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 580	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. kristensenii</i> FCF 604	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Y. massiliensis</i> CCUG 53443	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 216	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 457	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Y. massiliensis</i> FCF 465	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. massiliensis</i> FCF 494	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. mollaretii</i> ATCC 43969 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. mollaretii</i> WE 316/84	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. mollaretii</i> WA 751	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. mollaretii</i> WE 19/88	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp4	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp8	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafnose
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp10	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp14	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp15	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp21	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp22	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp26	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp28	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp30	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp31	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp32	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp34	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp35	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp37	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp40	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp43	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp45	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp46	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp52	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Continuação

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafinose
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp57	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp61	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp67	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp70	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp71	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp75	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp78	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp80	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp84	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp85	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp90	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp94	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp95	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp99	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp100	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp101	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp104	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Yp105	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Continua

Conclusão

Linhagens	Reações ou características														
	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	D-rafinose
<i>Y. rohdei</i> ATCC 43380	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Y. rohdei</i> WA 9/90	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Y. rohdei</i> FCF 466	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Y. rohdei</i> IP 8400	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> FCF 229	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Y. ruckeri</i> FCF 231	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Apêndice III – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a reconfirmação dos biotipos das linhagens representativas de *Y. pseudotuberculosis*

Linhagens	Fermentação		Utilização de Citrato	Biotipo
	Melibiose	Rafinose		
ATCC 29833	+	-	-	1
Yp1	-	-	-	2
Yp2	-	-	-	2
Yp4	-	-	-	2
Yp8	-	-	-	2
Yp10	-	-	-	2
Yp14	-	-	-	2
Yp15	-	-	-	2
Yp21	-	-	-	2
Yp22	-	-	-	2
Yp26	-	-	-	2
Yp28	-	-	-	2
Yp30	+	-	-	1
Yp31	+	-	-	1
Yp32	+	-	-	1
Yp34	-	-	-	2
Yp35	-	-	-	2
Yp37	-	-	-	2
Yp40	-	-	-	2
Yp43	-	-	-	2
Yp45	-	-	-	2
Yp46	-	-	-	2
Yp52	-	-	-	2
Yp57	-	-	-	2
Yp61	-	-	-	2
Yp67	-	-	-	2
Yp70	-	-	-	2
Yp71	-	-	-	2

Continua

Conclusão				
Linhagens	Fermentação		Utilização de Citrato	Biotipo
	Melibiose	Rafinose		
Yp75	-	-	-	2
Yp78	-	-	-	2
Yp80	-	-	-	2
Yp84	-	-	-	2
Yp85	-	-	-	2
Yp90	-	-	-	2
Yp94	-	-	-	2
Yp95	-	-	-	2
Yp99	-	-	-	2
Yp100	-	-	-	2
Yp101	-	-	-	2
Yp104	-	-	-	2
Yp105	-	-	-	2

Apêndice IV – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a reconfirmação dos biotipos das linhagens representativas de *Y. enterocolitica*

Linhagens	Fermentação			Esculina	Pirazinamidase	Lipase	Indol	Redução de nitrato	DNase	Biotipo
	Xilose	Trealose	Salicina							
FCF 125	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 153	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 195	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 387	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 483	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 505	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 571	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 587	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
FCF 610	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
IP 6883	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
IP 7326	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
IP 8395	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
IP 8396	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1A
ATCC 9610	+	+	-	-	-	+	+	+	-	1B
8081	+	+	-	-	-	+	+	+	-	1B
FCF 197	+	+	-	-	-	+	+	+	-	1B
FCF 474	+	+	-	-	-	+	+	+	-	1B
FCF 106	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 107	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 108	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 112	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 116	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 127	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 142	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 602	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
IP 7661	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
IP 7662	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
IP 7663	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
IP 7664	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
IP 7665	+	+	-	-	-	-	+	+	-	2
FCF 123	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3
FCF 327	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3
FCF 329	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3

Continua

Apêndice V – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a reconfirmação dos biotipos das linhagens representativas de *Y. intermedia*

Linhagens	Fermentação				Utilização de citrato	Biotipo
	Melibiose	Ramnose	α -metil-D-glicosídeo	L-rafnose		
ATCC 29909	+	+	+	+	+	1
FCF 297	+	+	+	-	-	6
FCF 323	+	-	+	+	+	4
FCF 349	+	+	+	+	+	1
IP 8181	+	+	+	+	+	1
IP 8184	+	+	+	+	+	1
IP 8373	+	+	+	+	+	1

Apêndice VI – Respostas dos testes fenotípicos utilizados para a reconfirmação dos biotipos das linhagens representativas de *Y. intermedia*

Linhagens	Fermentação		Biotipo
	Rafinose	Melibiose	
ATCC 43380	+	+	1
WA 9/90	+	+	1
FCF 466	+	+	1
IP 8400	+	+	1