UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens
de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas**

Miliane Rodrigues Frazão

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens
de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas**

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Miliane Rodrigues Frazão

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Frazão, Miliane Rodrigues

Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas. Ribeirão Preto, 2013.

89p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Falcão, Juliana Pfrimer

1. *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 2. Perfil de resistência a antimicrobianos
3. Potencial patogênico 4. ERIC-PCR 5. PFGE 6. MLVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Miliane Rodrigues Frazão

Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas

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

Agradecimentos

À Deus por me iluminar e me guiar durante toda a minha trajetória;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão pela oportunidade de realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pelo apoio e empenho e por toda a confiança em mim depositada;

Aos amigos do laboratório, Carolina, Fábio, Fernanda, Priscilla e Roberto, pela disposição em ajudar, pelo ambiente de trabalho harmonioso, pelas inúmeras sugestões e discussões científicas e pelos agradáveis momentos de descontração. É uma honra fazer parte desse grupo!

Aos meus pais Jair e Onélia, às minhas irmãs Liliane e Viviana e ao meu sobrinho Rafael por sempre me apoiarem, pelo amor incondicional e por compreenderem as minhas ausências. Amo vocês!

Às amigas Heliara e Renata pelo ótimo convívio na nossa residência e por tornarem os meus dias em Ribeirão Preto muito mais divertidos e felizes;

À Vania Claudia de Albuquerque pelo auxílio administrativo, pela ajuda com o resumo em espanhol e pela amizade;

À Jaqueline Passaglia e Eliane Figueiredo pelo apoio técnico no decorrer deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pelo uso do sequenciador 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;

À Adriana Aparecida Marques, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela eletroforese capilar realizada;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado;

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

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

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

RESUMO

Frazão, M. R. **Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas.** 2013. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Dentre as espécies do gênero *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica* é a espécie mais prevalente como causa de doença em humanos e animais. *Y. enterocolitica* é dividida em seis biotipos. Os biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 compreendem linhagens associadas à doença em humanos e animais, enquanto o biotipo 1A consiste de linhagens consideradas não patogênicas. Apesar de *Y. enterocolitica* biotipo 2 ser de importância clínica, há uma escassez de estudos no país, o que dificulta avaliar o envolvimento dessa bactéria como causa de doença em humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença no meio-ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial patogênico, determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e verificar a diversidade genotípica de linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 isoladas no Brasil. Foram estudadas 40 linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2, isoladas de humanos (5), ambiente (34) e animal (1), entre os anos de 1979 e 1998. Ademais, nas análises filogenéticas, foram acrescentadas 26 linhagens de *Y. enterocolitica* pertencentes aos outros biotipos, com o intuito de comparar as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 aos biotipos 1A, 1B, 3, 4 e 5. As linhagens de humanos e animal foram sensíveis a todos os 14 antimicrobianos testados. Dentre as 34 linhagens de ambiente, sete (20,6%) foram resistentes a um ou dois antimicrobianos, sendo esses, amicacina, cefoxitina, gentamicina, e sulfametoxazol - trimetoprima. Todas as linhagens apresentaram os genes *inv*, *ail*, *ystA*, *hreP*, *tccC* e *myfA*. Os genes *fepD* e *fes* foram detectados em 39 (97,5%) linhagens, o gene *virF* foi encontrado em três (7,5%) linhagens, os genes *ystB* e *fepA* não foram detectados em nenhuma linhagem. Todas as linhagens apresentaram comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos de atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina. O dendrograma de similaridade genética de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR) agrupou as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 em cinco grupos denominados A, B, C, D e E. Todas as linhagens, com exceção de duas, apresentaram similaridade genética superior a 88,3%. O dendrograma de similaridade genética de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) agrupou as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 em três grupos denominados I, J e K. A maioria das linhagens (72,5%) apresentou similaridade

genética superior a 78,3%. O dendrograma de similaridade genética de *Multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA) agrupou as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 em dois grupos denominados O e P com similaridade genética superior a 37,7%. Pode-se concluir que o potencial patogênico das linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 foi evidenciado pela prevalência da maioria dos marcadores de virulência, bem como, pelo comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos pesquisados. Algumas linhagens apresentaram-se resistentes a antimicrobianos de primeira escolha no tratamento de yersiniose, o que pode acarretar em falha terapêutica. Os resultados de ERIC-PCR e PFGE mostraram a alta similaridade entre as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2, sugerindo que as mesmas pouco se diferenciaram ao longo dos 19 anos e que possivelmente o meio ambiente tem sido uma fonte de contaminação para humanos e animais no Brasil. A técnica de MLVA agrupou as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 quanto à sua origem e a técnica de ERIC-PCR agrupou as linhagens de *Y. enterocolitica* biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4, e 5 quanto às diferentes patogenicidades características de cada biotipo.

Palavras-chave: *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, perfil de resistência a antimicrobianos, potencial patogênico, ERIC-PCR, PFGE e MLVA.

ABSTRACT

Fraão, M. R. **Molecular typing and pathogenic potential characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains of diverse origins.** 2013. 89f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Among the species of the genus *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica* is the most prevalent species that cause illness in humans and animals. *Y. enterocolitica* is divided into six biotypes. Biotypes 1B, 2, 3, 4 e 5 comprise strains associated to illness in humans and animals, while biotype 1A comprise strains considered nonpathogenic. Despite of the fact that *Y. enterocolitica* biotype 2 is of clinical importance, there is a paucity of studies in this country, which makes difficult to assess the involvement of this bacteria as a cause of illness in humans and animals, as well as to determine the impact of its presence in the environment. The aim of this work was to investigate the pathogenic potential, to determine the antimicrobial resistance profile and to verify the genetic diversity of *Y. enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. Forty strains of *Y. enterocolitica* biotype 2 isolated from humans (5), environment (34) and animal (1), between 1979 and 1998 were studied. Besides, in the phylogenetic analyzes it was added 26 *Y. enterocolitica* strains belonging to the other biotypes, in order to compare the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains to biotypes 1A, 1B, 3, 4 e 5. Humans and animals strains showed susceptibility to all 14 antibiotics tested. Among the 34 environment strains, seven (20.6%) were resistant to one or two antibiotics used such as amikacin, cefoxitin, gentamicin and sulfamethoxazole-trimethoprim. All the strains presented the genes *inv*, *ail*, *ystA*, *hreP*, *tccC* and *myfA*. Genes *fepD* and *fes* were detected in 39 (97.5%) strains, *virF* was found in three (7.5%) strains, and *ystB* and *fepA* were not detected in any strains. All the strains exhibited behavior related to virulence against the phenotypic tests of pyrazinamidase activity, esculin hydrolysis and salicin fermentation. The dendrogram of genetic similarity of Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) grouped the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains in five groups, designated A, B, C, D and E. All the strains, except two, showed a genetic similarity of more than 88.3%. The dendrogram of genetic similarity of Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) grouped the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains in three groups, designated I, J and K. The majority of the strains (72.5%) showed a genetic similarity of more than 78.3%. The dendrogram of genetic similarity of Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) grouped the *Y. enterocolitica*

biotype 2 strains in two groups, designated O and P with a genetic similarity of more than 37.7%. It is possible to conclude that the pathogenic potential of the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains was highlighted by the prevalence of the majority of the virulence markers searched, as well as by the behavior related to virulence against the phenotypic tests. Some strains were resistant to antimicrobials that are the first choice for yersiniosis treatment, which can result in therapeutic failure. The results of ERIC-PCR and PFGE showed a high genetic similarity between the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains, suggesting that the strains differed little over 19 years, and that the environment has been possibly a source of humans and animals infections in Brazil. The MLVA technique grouped the *Y. enterocolitica* biotype 2 strains according to their origins, and the ERIC-PCR technique grouped the *Y. enterocolitica* biotypes 1A, 1B, 2, 3, 4 and 5 strains according to the different pathogenicity characteristics of each biotype.

Keywords: *Yersinia enterocolitica* biotype 2, profile antimicrobial resistance, pathogenic potential, ERIC-PCR, PFGE and MLVA.

RESUMEN

Frazão, M. R. **Tipaje molecular y caracterización del potencial patogénico de linajes de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de orígenes diversos.** 2013. 89f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Entre las especies del género *Yersinia*, la *Yersinia enterocolitica* es la especie más prevalente como causa de la enfermedad en humanos y animales. *Y. enterocolitica* se divide en seis biotipos. Los biotipos 1B, 2, 3, 4 y 5 comprenden linajes asociados a la enfermedad en humanos, mientras el biotipo 1A consiste de linajes considerados no patogénicos. A pesar de *Y. enterocolitica* biotipo 2 ser de importancia clínica, hay una escasez de estudios en el país, lo que dificulta evaluar esa bacteria como causa de enfermedad en humanos y animal, así como determinar el impacto de su presencia en el medio ambiente. El objeto de este trabajo fue investigar el potencial patogénico, determinar el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y verificar la diversidad genotípica de linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 aisladas en Brasil. Se estudió 40 linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2, aisladas de humanos (5), del ambiente (34) y del animal (1) entre los años de 1979 y 1998. Además, en los análisis filogenéticos fueron acrecidos 26 linajes de *Y. enterocolitica* pertenecientes a otros biotipos, con el intuito de comparar los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 a los biotipos 1A, 1B, 3, 4 y 5. Los linajes de humanos y animal fueron sensibles a todos los 14 antimicrobianos probados. Entre los 34 linajes de ambiente, siete (20,6%) fueron resistentes a uno o dos antimicrobianos, siendo esos, amikacina, cefoxitina, gentamicina, y sulfametoxazol - trimetoprim. Todos los linajes presentaron los genes *inv*, *ail*, *ystA*, *hreP*, *tccC* y *myfA*. Los genes *fepD* y *fes* fueron detectados en 39 (97,5%) linajes, el gene *virF* fue encontrado en tres (7,5%) linajes y los genes *ystB* y *fepA* no fueron detectados en ningún linaje. Todos los linajes presentaron comportamiento relacionado a la virulencia frente a las pruebas fenotípicas de actividad de la pirazinamida, hidrólisis de la esculina y fermentación de la salicina. El dendograma de similitud genético de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR) agrupó los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 en cinco grupos denominados A, B, C, D y E. Todos los linajes, a excepción de dos, presentaron similitud genética superior a 88,3%. El dendograma de similitud genético de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) agrupó los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 en tres grupos denominados I, J y K. La mayoría de los linajes (72,5%) presentó similitud genético superior a 78,3%. El dendograma

de similitud genético de *Multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA) agrupó los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 en dos grupos denominados O y P, con similitud genético superior a 37,7%. Se puede concluir que el potencial patogénico de los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 fue evidenciado por medio de la prevalencia de la mayoría de los marcadores de virulencia, así como, por el comportamiento relacionado a la virulencia frente a las pruebas fenotípicas. Algunos linajes se mostraron resistentes a los antimicrobianos de primera elección en el tratamiento de yersiniosis, lo que puede llevar a falla terapéutica. Los resultados de ERIC-PCR y PFGE mostraron alta similitud entre los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2, sugiriendo que las mismas poco se diferenciaron a lo largo de 19 años y que posiblemente el medio ambiente ha sido una fuente de contaminación para humanos y animales en Brasil. La técnica de MLVA agrupó los linajes de *Y. enterocolitica* biotipo 2 cuanto a su origen y la técnica de ERIC-PCR agrupó los linajes de *Y. enterocolitica* biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4, y 5 cuanto a las distintas patogenicidades características de cada biotipo.

Palabras llave: *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, perfil de resistencia a los antimicrobianos, potencial patogénico, ERIC-PCR, PFGE y MLVA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%	41
Figura 2 -	Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5%	42
Figura 3 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para as 40 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	44
Figura 4 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para as 66 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> estudadas	45
Figura 5 -	Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> estudadas digeridas com a enzima <i>XbaI</i>	46
Figura 6 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE para as 40 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	48
Figura 7 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE para as 66 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> estudadas	49
Figura 8 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 40 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	51
Figura 9 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 58 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> estudadas	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Testes bioquímicos para a diferenciação das espécies de <i>Yersinia</i>	3
Tabela 2 -	Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de <i>Y. enterocolitica</i> após incubação a 28°C por 48 horas	4
Tabela 3 -	Características das 66 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> estudadas ...	22
Tabela 4 -	Características das quatro linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> utilizadas como controle positivo na pesquisa dos marcadores de virulência por PCR	24
Tabela 5 -	Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos marcadores de virulência por PCR	29
Tabela 6 -	<i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação dos genes <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>ystA</i> , <i>ystB</i> , <i>virF</i> , <i>myfA</i> , <i>fepA</i> , <i>fepD</i> , <i>fes</i> , <i>tccC</i> e <i>hreP</i> , tamanho dos produtos de amplificação gerados e temperatura de hibridação	30
Tabela 7 -	Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de ERIC-PCR	31
Tabela 8 -	Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos <i>loci</i> V2A, V4 e V6	35
Tabela 9 -	Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos <i>loci</i> V5, V7 e V9	35
Tabela 10 -	<i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação dos VNTRs	36
Tabela 11 -	Perfil de resistência aos antimicrobianos amoxicilina + ácido clavulânico, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina das linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	39
Tabela 12 -	Características fenotípicas relacionadas à virulência das 40 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	40
Tabela 13 -	Frequência dos marcadores de virulência pesquisados para as 40 linhagens de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2 estudadas	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ail	<i>Attachment invasion locus</i>
AMI	Amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFO	Cefoxitina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIN	Cefsulodina -irgasan-novobiocina
D	Índice de discriminação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPM	Escola Paulista de Medicina
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
F	<i>Forward</i>
GEN	Gentamicina
HPI	<i>High Pathogenicity Island</i>
inv	<i>Invasion</i>
IRU	<i>Intergenic repeat units</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MILi	Motilidade-indol-lisina
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multilocus variable number tandem repeat analysis</i>
Myf	<i>Mucoid Yersinia factor</i>
NR	Não realizado
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
pYV	<i>Plasmid for Yersinia virulence</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para

R	<i>Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Sem informação
spp.	Espécies
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SUT	Sulfametoxazol - trimetoprima
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
TSA	<i>Tryptone Soya Agar</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
U	Unidade (s)
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
v	Variável
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
Yop	<i>Yersinia outer proteins</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
™	<i>Trademark</i>
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
□	Somatório
≥	Maior ou igual a
-	Negativo
+	Positivo
(+)	Fracamente positivo
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
Kb	Quilobase (s)
KDa	Quilodalton (s)
mg	Miligrama (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
pmol	Picomol
T	Timina
V	Volt (s)
X	Vez (es)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Gênero <i>Yersinia</i>	2
1.2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	4
1.2.1. Características da espécie	4
1.2.2. Marcadores relacionados à virulência	6
1.2.3. Manifestações clínicas e patogênese	9
1.2.4. Tratamento e suscetibilidade a antimicrobianos	10
1.3. Evolução dos métodos de tipagem bacteriana	11
1.3.1. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> PCR	11
1.3.2. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE)	13
1.3.3. <i>Multilocus variable number tandem repeat analysis</i> (MLVA)	14
1.4. Isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> biotipo 2	15
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Linhagens bacterianas	22
4.2. Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica	24
4.3. Reconfirmação sorológica	25
4.4. Armazenamento das linhagens bacterianas	25

4.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	26
4.6. Testes fenotípicos relacionados à virulência	26
4.6.1. Autoaglutinação a 37°C	26
4.6.2. Dependência ao cálcio a 37°C e absorção do corante vermelho congo	27
4.6.3. Atividade da enzima pirazinamidase	27
4.6.4. Fermentação da salicina	27
4.6.5. Hidrólise da esculina	27
4.7. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	28
4.8. Pesquisa dos marcadores relacionados à virulência por PCR	29
4.9. Amplificação das sequências ERIC	31
4.9.1. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de ERIC-PCR	32
4.9.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de ERIC-PCR	32
4.10. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE)	32
4.10.1. Preparo das amostras	32
4.10.2. Digestão dos <i>plugs</i>	33
4.10.3. Corrida eletroforética	33
4.10.4. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de PFGE	34
4.10.5. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE	34
4.11. <i>Multilocus variable number tandem repeat analysis</i> (MLVA)	34
4.11.1. Análise dos picos gerados com os dados da eletroforese capilar	36
4.11.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de MLVA	37
4.12. Cálculo do índice de discriminação	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica	39
5.2. Reconfirmação sorológica	39
5.3. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	39
5.4. Testes fenotípicos relacionados à virulência	40
5.5. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	40
5.6. Pesquisa dos marcadores de virulência por PCR	41
5.7. Amplificação das sequências ERIC	42

5.7.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de ERIC-PCR	43
5.8. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE)	46
5.8.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE	47
5.9. <i>Multilocus variable number tandem repeat analysis</i> (MLVA)	50
5.9.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de MLVA	50
5.10. Índice de discriminação	53
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	79
ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Yersinia*

Atualmente o gênero *Yersinia* é composto por 17 espécies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. molarretti*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* e *Y. similis* (DRUMMOND et al., 2012).

O nome *Yersinia* foi dado em homenagem ao bacteriologista francês Alexandre Emile Jean Yersin que isolou pela primeira vez, em 1894, o agente da peste, durante a terceira pandemia (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

O gênero *Yersinia* pertence à Família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram-negativo que mede em torno de 0,5 a 0,8 µm de largura por 1 a 3 µm de comprimento, oxidase negativo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos. As bactérias pertencentes a esse gênero são lactose negativas e psicotróficas, ou seja, têm a habilidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 0°C a 44°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é entre 25°C e 28°C (FALCÃO; FALCÃO, 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; DRUMMOND et al., 2012).

Dentre as espécies do gênero *Yersinia*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são as espécies comprovadamente patogênicas para humanos e animais (ROBINS-BROWNE, 2001). *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são bactérias enteropatogênicas que causam infecções intestinais. Estas infecções podem resultar em enterocolite, linfadenite mesentérica, e raramente septicemia. *Y. pestis* é o agente da peste negra, que é uma doença frequentemente fatal quando não tratada. Os três tipos principais de infecção por *Y. pestis*, bubônica, septicemia, e pneumônica, são definidos pela natureza dos órgãos colonizados pela bactéria. *Y. ruckeri* é um importante patógeno de peixes. Já as outras espécies são consideradas ambientais e não patogênicas, porém há relatos de isolamento de algumas dessas espécies em humanos com distúrbios gastrointestinais (BOTTONNE, 1997; SULAKVELIDZE, 2000; ROBINS-BROWNE, 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

As espécies de *Yersinia* têm um conteúdo de G + C que varia de 46 a 50% e são relacionadas aos demais membros da Família *Enterobacteriaceae* por 10 a 32%. O relacionamento intraespécie é variável de 55 a 74%, com exceção de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* que possuem mais de 90% de similaridade entre si (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

A diferenciação entre as espécies desse gênero é feita frente ao comportamento a vários testes bioquímicos, como: indol, ornitina-descarboxilase, motilidade, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, urease, além da capacidade de metabolizar carboidratos como sacarose, celobiose, sorbose, rafinose, ramnose, melibiose e sorbitol (SULAKVELIDZE, 2000; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

A Tabela 1 traz os testes bioquímicos realizados para a diferenciação entre todas as espécies do gênero *Yersinia*.

Tabela 1 - Testes bioquímicos para a diferenciação das espécies de *Yersinia*

Espécies	Reações ^a													
	motilidade	urease	Voges-Proskauer	indol	citrato	ornitina	esculina	mucato	Sacarose	Fermentação				
										L-Ramnose	D-Celobiose	D-Melibiose	L-Sorbose	D-Sorbitol
<i>Y. pestis</i>	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Y. similis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	v	-	+	v	-	+	-	+	-	v	v
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	+	+	-	v	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	+	+	+	v	+	v	-	+	+	+	-	+	+
<i>Y. aleksiciae</i>	+	+	-	v	-	+	-	NR	-	-	+	-	v	+
<i>Y. aldovae</i>	+	+	+	-	v	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Y. rohdei</i>	+	v	-	-	+	+	-	-	+	-	+	v	+	+
<i>Y. molaretii</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>Y. bercovieri</i>	+	+	-	-	-	+	v	-	+	-	+	-	-	+
<i>Y. ruckeri</i>	v	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i>	+	+	-	+	v	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Y. nurmii</i>	+	-	+	-	NR	+	-	NR	+	-	(+)	-	-	-
<i>Y. pekkannenii</i>	-	+	-	-	NR	-	-	NR	-	-	+	-	-	-
<i>Y. entomophaga</i>	+	-	NR	-	+	+	-	NR	+	-	+	+	-	-

^a Incubação feita a 28°C por 7 dias para a fermentação dos carboidratos e a 28°C por 48 horas para os demais testes. +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas; (+), fracamente positiva; v (variável), 11 a 98% de amostras positivas; NR (não realizado) (HURST et al., 2011; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011a; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011b; SOUZA et al., 2011).

As espécies de *Yersinia* crescem na maioria dos meios de cultura de rotina, como, ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey. Em ágar sangue de carneiro a 5%, as colônias não são hemolíticas (FALCÃO; FALCÃO, 2006). Devido ao fato de que as espécies de *Yersinia* crescem mais lentamente do que as outras espécies pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*, o uso de meios seletivos para o isolamento de *Yersinia* é recomendado. Para tal finalidade, tem sido utilizado o meio seletivo ágar CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina), que inibe o crescimento da maioria das outras espécies da Família *Enterobacteriaceae* (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011). *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* crescem bem em meios que contêm altas concentrações de sais biliares, e dessa forma, são cultivadas com facilidade em ágar MacConkey e ágar SS (*Salmonella-Shigella*). Nesses meios de cultura, as colônias são pequenas, redondas, opacas, incolores e medem aproximadamente 1 mm de diâmetro após incubação de 25°C a 30°C durante 24 horas (ROBINS-BROWNE, 2001; FALCÃO; FALCÃO, 2006; SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

1.2. *Yersinia enterocolitica*

1.2.1. Características da espécie

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

Y. enterocolitica é uma espécie heterogênea, que pode ser dividida em seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4 e 5) de acordo com a resposta frente a diferentes testes fenotípicos (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007), como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Testes bioquímicos realizados para diferenciar os biotipos de *Y. enterocolitica* após incubação a 28°C por 48 horas

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

^a +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas; (+), fracamente positiva; v (variável), 11 a 98% de amostras positivas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Os biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 compreendem linhagens que são associadas com doenças em humanos e animais, enquanto o biotipo 1A consiste de linhagens não patogênicas. Entretanto, existem relatos de linhagens pertencentes ao biotipo 1A que foram isoladas de humanos com gastroenterites (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FALCÃO et al., 2008; DRUMMOND et al., 2012; CAMPIONI; FALCÃO, 2013).

A divisão de *Y. enterocolitica* em duas subespécies, com base em valores de hibridação DNA-DNA e sequências do gene 16S rRNA foi proposta por Neubauer et al. (2000a) e Neubauer et al. (2000b). A primeira subespécie, denominada *Y. enterocolitica* subespécie *enterocolitica*, é formada por linhagens do biotipo 1B que são altamente patogênicas e frequentemente isoladas na América do Norte. A segunda subespécie, chamada de *Y. enterocolitica* subespécie *paleartica*, é formada por linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 2, 3, 4 e 5 e é isolada mundialmente (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

O esquema antigênico de *Y. enterocolitica* inclui 76 antígenos somáticos e 44 antígenos flagelares (WAUTERS et al., 1991), no entanto, somente a caracterização dos antígenos somáticos é utilizada rotineiramente, pois os antígenos flagelares não tem importância para o diagnóstico em laboratórios de rotina. As linhagens patogênicas de *Y. enterocolitica* usualmente pertencem aos sorogrupos O:1,2,3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32, O:5,27; O:13a,13b; O:18; O:20 e O:21 e os bio-sorogrupos mais relacionados como causa de doenças em humanos são 4/O:3; 1B/O:8; 2/O:9 e 2/O:5,27 (FALCÃO; FALCÃO, 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; DRUMMOND et al., 2012).

Y. enterocolitica também pode ser classificada quanto à sensibilidade a diferentes fagos. No esquema para fagotipagem existem nove fagotipos: II, VIII, IX_a, IX_b, XI, X, X₃, X_z e X_o (NICOLLE et al., 1976). Devido à necessidade de manter os estoques de fagos biologicamente ativos e da disponibilidade de linhagens controle, a fagotipagem está disponível em um número reduzido de laboratórios (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

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

de água, fezes e alimentos (FALCÃO et al., 2004; FALCÃO et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FALCÃO et al., 2008).

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

1.2.2. Marcadores relacionados à virulência

A virulência de *Y. enterocolitica* está associada a vários genes. Esses marcadores de virulência são codificados tanto por genes plasmidiais contidos no plasmídio pYV (*plasmid for Yersinia virulence*) quanto por genes cromossomais. A expressão desses genes é dependente da temperatura, e enquanto os genes plasmidiais são expressos a 37°C, os genes cromossomais são normalmente expressos a 25°C (ROBINS-BROWNE, 2001).

Y. enterocolitica, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* carregam o plasmídio pYV. A presença do plasmídio pYV permite que *Yersinia* sobreviva e multiplique-se nos tecidos linfóides do seu hospedeiro (CORNELIS, 1998). O plasmídio pYV codifica uma proteína de membrana externa YadA (*Yersinia adhesin A*), e um conjunto de proteínas regulatórias, estruturais e efetoras chamado Yops (*Yersinia outer proteins*). A proteína YadA é a principal proteína de membrana externa, a qual forma uma matriz fibrilar nas superfícies de *Y. enterocolitica* e é apenas expressa a 37°C. Além disso, YadA tem a função de inibir a resposta imune inata do hospedeiro, conferindo resistência à ação do sistema complemento com consequente inibição da fagocitose e do *burst* respiratório (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; DRUMMOND et al., 2012).

Os genes *yops* estão localizados no plasmídio pYV e codificam as proteínas Yops. Yops são secretadas por meio de um sistema de secreção de tipo III, codificado pelo gene *ysc*. As Yops conferem à *Yersinia* a capacidade de resistir à resposta imune não específica do hospedeiro, além de proteger a *Yersinia* do macrófago, inibindo a sua fagocitose e induzindo a apoptose. O sistema de secreção do tipo III é responsável por injetar diretamente as Yops no citoplasma da célula do hospedeiro. Em *Y. enterocolitica*, o gene *virF* é o principal gene

regulador da expressão das Yops (CORNELIS et al., 1998; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

As linhagens de *Yersinia* que são portadoras do plasmídio de virulência pYV expressam ainda diversas propriedades fenotípicas tais como autoaglutinação a 37°C, absorção do corante vermelho congo, dependência ao cálcio a 37°C, dentre outras. Assim, correlacionando a presença do plasmídio com essas características fenotípicas, tem-se um conjunto de dados para definir o potencial patogênico de *Yersinia* e a capacidade do micro-organismo causar doenças em humanos e animais (FARMER III et al., 1992; ROBINS-BROWNE, 2001).

Entre os genes cromossomais relacionados à virulência que foram identificados e bem caracterizados estão os genes relacionados à síntese de lipopolissacarídeo (LPS), adesão e invasão de células eucarióticas, produção de urease, produção de enterotoxinas, síntese de fímbrias, captura de ferro, entre outros (CARNIEL, 1995).

A invasão das células epiteliais requer pelo menos dois genes cromossômicos, *inv* (*invasion*) e *ail* (*attachment invasion locus*). O gene *inv* codifica uma proteína de membrana externa, denominada Inv, de 92 kDa, que desempenha um papel vital na entrada de *Y. enterocolitica* nas células epiteliais do íleo durante os estágios iniciais da infecção. Este gene encontra-se em todas as espécies de *Yersinia*, entretanto, é funcional apenas nas linhagens patogênicas. O gene *ail*, codifica a proteína de superfície Ail, de 17 kDa, que medeia a resistência ao efeito bactericida do complemento. Em contraste com o gene *inv*, o *ail* é encontrado apenas em bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* associados a doenças (CARNIEL, 1995; ROBINS-BROWNE, 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; LEO; SKURNIK, 2011).

Y. enterocolitica expressa fímbrias que são encontrados em sua superfície (CARNIEL, 1995). *Y. enterocolitica* sintetiza uma estrutura fibrilar denominada Myf (*mucoïd Yersinia factor*), que confere aspecto mucóide às colônias bacterianas que as expressam. A síntese dessa fímbria envolve três genes cromossômicos: *myfA*, *myfB*, e *myfC*. Myf pode servir como um fator de colonização intestinal em *Y. enterocolitica*, conferindo assim, a aderência da bactéria ao epitélio intestinal (CARNIEL, 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Y. enterocolitica secreta um enterotoxina termoestável, YstA, que é codificada pelo gene *ystA*. É uma proteína de 30 aminoácidos que apresenta em sua porção amino-terminal elevada homologia com a toxina termoestável de *Escherichia coli* enterotoxigênica. YstA é produzida a temperaturas inferiores a 30°C, e dessa forma, não é expressa *in vivo*, mas a resistência da YstA ao pH do estômago, pode causar intoxicação alimentar quando é

produzida em alimentos e ingerida pré-formada. O gene *ystA* é restrito apenas às sorovariedades patogênicas de *Y. enterocolitica* (ROBINS-BROWNE, 2001).

Além da proteína YstA, *Y. enterocolitica* expressa outra enterotoxina denominada YstB, que é codificada pelo gene *ystB*, que acredita-se que, assim como a proteína YstA, esta também possa ser responsável por causar diarreia (ROBINS-BROWNE, 2001). Estudos demonstraram que o gene *ystB* é bastante prevalente em linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 1A (BHAGAT; VIRDI, 2007).

Os isolados clínicos de *Yersinia* enteropatogênicas produzem a enzima urease, que é codificada pelo gene *ure*. Esta enzima hidrolisa a ureia para formar ácido carbônico e amônia, levando ao aumento do pH. A atividade da urease pode contribuir para a virulência, ao conferir tolerância ácida e aumentando assim a sobrevivência da bactéria no estômago (ROBINS-BROWNE, 2001).

A protease HreP é codificada pelo gene *hreP*. As proteases são conhecidas por contribuírem com a patogenicidade bacteriana ao interferirem com as proteínas dos tecidos do hospedeiro e assim inativar importantes proteínas chaves de defesa. Em um estudo realizado por Heusipp, Young e Miller (2001), foi demonstrado que a protease HreP tem importância na patogênese de *Y. enterocolitica*, uma vez que, linhagens de *Y. enterocolitica* mutantes para o gene *hreP*, apresentaram redução significativa na virulência.

Em *Y. enterocolitica*, a síntese de lipopolissacarídeo (LPS) é codificada pelo locus *rfb* e é afetada por temperaturas elevadas, pois ocorrem alterações na composição de seus ácidos graxos e açúcares a 35-37°C. Ao multiplicar-se a 25°C, *Y. enterocolitica* possui um LPS liso e expressa a cadeia completa do antígeno somático O, enquanto que ao multiplicar-se a 37°C apresenta células rugosas devido à repressão da síntese do LPS. O LPS liso pode estimular a virulência por aumentar a hidrofobicidade e, assim, facilitar a passagem da bactéria através do muco do epitélio intestinal. Por outro lado, o LPS rugoso por apresentar cadeias alongadas somáticas (O), pode ocultar proteínas de superfície associadas à virulência tais como YadA e Ail, requeridas na fase tardia da infecção. A repressão da síntese do LPS a 37°C pode aumentar as chances da bactéria sobreviver nos tecidos, permitindo-lhe expor na superfície seus determinantes de virulência no período apropriado da infecção (ROBINS-BROWNE, 2001).

O gene *tccC* é homólogo ao gene *tc* (*insecticidal toxin complex*) de *Photobacterium luminescens*, que permite que essa bactéria possa sobreviver em insetos. Entretanto, não é sabido o motivo pelo qual linhagens que não vivem em insetos, como é o caso de *Y. enterocolitica*, possuem genes homólogos ao gene *tc*. Acredita-se que em *Yersinia* o gene

tccC codifique alguma toxina que contribua para a atividade enterotóxica dessa bactéria (TENNANT et al., 2005).

O ferro é um fator de crescimento essencial para a multiplicação de quase todas as bactérias, incluindo *Y. enterocolitica*. A habilidade de capturar o ferro *in vivo* é um dos principais fatores que diferenciam linhagens de alta e baixa patogenicidade (CARNIEL, 1995). O armazenamento, o transporte, a biossíntese e regulação de ferro são importantes para a adaptação das espécies de *Yersinia* a diferentes condições ambientais. Uma via para a captação de ferro é a secreção de pequenas moléculas denominadas sideróforos. Estas moléculas quelam o ferro ligado a proteínas eucarióticas, transportando-o a receptores específicos na membrana externa bacteriana e liberando-o no citoplasma. Yersiniabactina é um sideróforo, o qual é sintetizado apenas por *Yersinia* de alta patogenicidade. *Y. enterocolitica*, incluindo o sorogrupo O:8, são capazes de sintetizar yersiniabactina. A biossíntese de yersiniabactina e genes de transporte são agrupados dentro de uma região do cromossomo conhecida como ilhas de alta patogenicidade (HPI) (CARNIEL, 2001). Linhagens de *Y. enterocolitica* de baixa patogenicidade, incluindo as dos sorogrupos O:3 e O:9, utilizam sideróforos exógenos como a ferrioxamina, aumentando assim a sua capacidade de disseminação no hospedeiro. Estes sistemas de ferro-regulação asseguram a sobrevivência e a multiplicação de *Yersinia* em um ambiente competitivo de ferro (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007). Especificamente, em *Y. enterocolitica*, o sideróforo é transportado por proteínas de membrana codificadas pelos genes *fep* e o gene *fes* promove a liberação do ferro no citoplasma bacteriano (SCHUBERT; FISCHER; HEESEMAN, 1999).

Y. enterocolitica pode ainda expressar ou não características fenotípicas como atividade da enzima pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina, sendo essas características relacionadas à virulência (KANDOLO; WAUTERS, 1985; FARMER III et al. 1992).

1.2.3. Manifestações clínicas e patogênese

A doença causada por *Y. enterocolitica* é denominada yersiniose e é adquirida, sobretudo, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com a bactéria. A dose infecciosa é desconhecida, porém, acredita-se que seja maior que 10^4 UFC/mL. Os sintomas iniciam-se após 24 a 48 horas da ingestão da bactéria. A alta incidência de infecção é reportada em crianças com até quatro anos de idade que apresentam uma diarreia autolimitada com ou sem a presença de sangue. Jovens e adultos podem apresentar dores abdominais, além de diarreia e vômito. Dessa forma, as manifestações da gastroenterite podem variar de acordo

com a idade e o sistema imune do hospedeiro (BOTTONNE, 1997; ROBINS-BROWNE, 2001; DRUMMOND et al., 2012; NOCKER; FALCÃO; FALCÃO, 2010).

Após a ingestão, *Y. enterocolitica* migra através do estômago e do intestino delgado para a porção terminal do íleo. As bactérias ligam-se ao folículo do epitélio associado às placas de Peyer, que são uma parte do intestino associada ao tecido linfático. *Y. enterocolitica* penetra na mucosa intestinal, por meio de células M, que recobrem os folículos linfóides intestinais. A adesão e invasão das células M são mediadas por determinantes cromossômicos, proteínas Inv e Ail e plasmidiais, YadA. Depois da penetração no epitélio intestinal, *Yersinia* coloniza as Placas de Peyer, causando destruição tecidual e levando à formação de microabcessos. A capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro dos folículos linfóides e outros tecidos está associada com a presença do plasmídio de virulência pYV, o qual é essencial para a patogênese de *Yersinia*. Propriedades antifagocíticas de *Yersinia* são mediadas principalmente por Yops, que através do contato bactéria-fagócito, subverte a função fagocitária e permite a sobrevivência e multiplicação extracelular no tecido linfóide do hospedeiro. Normalmente, a infecção é limitada à área intestinal, mas, algumas vezes, os micro-organismos são drenados para os linfonodos mesentéricos e dão origem a uma infecção sistêmica (ROBINS-BROWNE, 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

1.2.4. Tratamento e suscetibilidade a antimicrobianos

A maioria dos casos de gastroenterites causados por *Y. enterocolitica*, não requer tratamento, exceto em complicações da doença, especialmente em pacientes imunocomprometidos. As opções de tratamento incluem sulfametoxazol - trimetoprima, aminoglicosídeos e fluoroquinolona (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; FÁBREGA; VILA, 2012).

As linhagens de *Y. enterocolitica* são usualmente suscetíveis *in vitro* a aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina, tobramicina), tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima) e quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina) (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Y. enterocolitica produz frequentemente β -lactamases e usualmente é resistente a penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. Entretanto, diferenças na suscetibilidade aos β -lactâmicos são encontradas entre os diferentes bio-sorogrupos de *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

A diferença na suscetibilidade aos antimicrobianos encontrada nos diferentes biotipos de *Y. enterocolitica* pode ser explicada, em parte, pela produção de dois diferentes tipos de β -

lactamases (A e B). Essas duas lactamases conferem resistência à ampicilina, cefalotina, carbenicilina e ticarcilina. Enquanto o bio-sorogrupo 4/O:3 de *Y. enterocolitica*, geralmente, produz ambas enzimas A e B, 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 (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

1.3. Evolução dos métodos de tipagem bacteriana

Os métodos clássicos de tipagem molecular baseavam-se em metodologias fenotípicas tais como fagotipo, biotipo, sorotipo, padrão de resistência a antimicrobianos, entre outros. Entretanto, esses métodos convencionais são muitas vezes limitados devido a sua baixa capacidade em discriminar linhagens pertencentes a uma mesma espécie e a problemas referentes à reprodutibilidade intra e inter laboratoriais (OLIVE; BEAN, 1999; FOXMAN et al., 2005).

Assim, na tentativa de suprir os problemas com reprodutibilidade e baixo poder de discriminação, métodos genotípicos têm sido utilizados com grande sucesso na caracterização, identificação e em estudos epidemiológicos de tipagem bacteriana. Tais estudos de investigação epidemiológica molecular permitem determinar a fonte e os veículos de transmissão, além de informar se os micro-organismos envolvidos nos surtos representam ou não um único clone (OLIVE; BEAN, 1999, VAN BELKUM et al., 2001).

Vários métodos moleculares vêm sendo utilizados na tipagem molecular de bactérias de interesse clínico, incluindo bactérias pertencentes ao gênero *Yersinia*. As metodologias de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Repetitive extragenic palindrome* PCR (REP-PCR), ribotipagem, *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), sequenciamento do gene 16 rRNA, *multilocus sequence typing* (MLST), *multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA) têm sido utilizados com sucesso para tais finalidades (ITEMAN; GUIYOULE; CARNIEL, 1996; GUIYOULE et al., 1997; LOBATO et al., 1998; WOJCIECH et al., 2004; FALCÃO et al., 2006; GIERCZYNSKI et al., 2007; SOUZA et al., 2010, SIHVONEN et al., 2011; LUCERO ESTRADA et al., 2011; VIRTANEN et al., 2013; CAMPIONI; FALCÃO, 2013).

1.3.1. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR

Famílias de sequências intergênicas repetitivas (30 - 150 pb) têm sido descritas em bactérias entéricas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Pouco se sabe sobre a origem, a evolução e a possível função desses elementos. Muitas famílias de elementos repetitivos são restritas a uma única espécie ou a espécies estreitamente relacionadas, enquanto outras espécies bacterianas não possuem tais elementos. Isto sugere que, se estas repetições têm alguma função, essas funções podem não se aplicar a todos os membros da família, e não são fundamentais no crescimento, replicação e sobrevivência bacterianos (WILSON; SHARP, 2006).

A família de elementos repetitivos denominada *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) também denominada como *Intergenic repeat units* (IRUs), é um palíndromo imperfeito de 127 pb que ocorre em múltiplas cópias no genoma de bactérias entéricas e vírios (WILSON, SHARP, 2006). Sequências ERIC foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e outros membros da Família *Enterobacteriaceae*, bem como, em *Vibrio cholerae* (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Esses elementos ERIC contêm uma região central altamente conservada e localizada em regiões intergênicas não codificantes do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

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

As sequências ERIC têm sido utilizadas como base para a técnica de tipagem molecular bacteriana denominada ERIC-PCR. Essa metodologia utiliza uma reação da polimerase em cadeia (PCR) com *primers* consenso para amplificar regiões entre as sequências ERIC do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON, SHARP, 2006).

Essas análises por PCR revelam distâncias inter-ERIC e padrões de bandas específicos para as espécies bacterianas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Como diferentes linhagens apresentam polimorfismo quanto ao número e a posição dessas sequências, o padrão de bandas resultante da PCR é utilizado para diferenciá-las. Assim, a comparação entre os perfis eletroforéticos de linhagens diferentes pode ser utilizada para determinar o grau de similaridade entre as linhagens testadas. Considerando que o perfil de bandas gerados através dessa reação é reprodutível e que uma mesma linhagem testada repetidamente irá apresentar sempre o mesmo padrão, pode-se dizer que esse método de tipagem é eficiente e

que o padrão de bandas obtido é específico para cada linhagem (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992).

1.3.2. *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984 como uma ferramenta para estudar o DNA cromossômico de organismos eucariotos. Subsequentemente, o PFGE provou ser uma técnica de tipagem molecular bacteriana altamente eficaz (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

Nessa técnica, é feita a construção de *plugs* de agarose a partir de uma suspensão bacteriana. Posteriormente, a bactéria inteira que se encontra embebida no *plug*, é lisada com o uso de detergentes e proteinase K, obtendo-se assim, o DNA bacteriano livre, que é então digerido com uma enzima de restrição que possui poucos sítios de reconhecimento, gerando um perfil com aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 Kb em tamanho. Essencialmente, todos esses fragmentos podem ser separados em um padrão de bandas distintas por PFGE. Ao invés de se aplicar a corrente elétrica em uma única direção, como em uma eletroforese convencional, nessa técnica, a corrente é aplicada, primeiramente, em uma direção a partir de um conjunto de eletrodos, em seguida, a corrente elétrica migra para o segundo conjunto de eletrodos por um curto período de tempo e então, migra para um terceiro conjunto de eletrodos. Assim, o campo elétrico que causa a migração do DNA no gel de agarose é produzido por pulsos que se alternam entre três conjuntos de eletrodos. Dessa maneira, o DNA migra de forma serpentina através do gel, e os fragmentos gerados pela digestão com a enzima de restrição são separados com eficiência (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

A análise do padrão de bandas gerado é realizada através de *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo, assim, a similaridade genotípica entre elas (SINGH et al., 2006).

Todas as espécies bacterianas podem ser tipadas por PFGE, embora o isolamento do DNA intacto seja tecnicamente difícil para algumas espécies. Como exemplo, o DNA cromossômico de algumas linhagens de *Clostridium difficile* pode degradar-se espontaneamente durante o processo de lise celular, tornando essa técnica impraticável. Entretanto, PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular mais reprodutível e com maior poder discriminatório e vem sendo aplicado com sucesso para tipagem de uma quantidade numerosa de espécies bacterianas, tanto gram-negativas quanto gram-positivas (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997; GOERING, 2010).

1.3.3. *Multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA)

O genoma bacteriano possui muitas regiões com nucleotídeos que se repetem em sequências codificantes e não codificantes do DNA. Quando estas repetições são diretamente adjacentes umas às outras e o seu número no mesmo *locus* varia entre isolados, as respectivas regiões genômicas são chamadas de *variable number tandem repeat* (VNTR). Dessa forma *multilocus variable number tandem repeat analysis*, (MLVA) é um método que determina o número de repetições de sequências em *tandem* em diferentes *loci* no genoma bacteriano (SABAT et al., 2013).

Os VNTRs têm se mostrado como úteis marcadores moleculares epidemiológicos devido à sua alta variabilidade. Eles têm sido utilizados com sucesso para diferenciar linhagens de uma mesma espécie (VAN BELKUM, 2007).

Atualmente, o MLVA figura como uma das tecnologias mais promissoras em relação à elucidação da epidemiologia de micro-organismos, tal como as bactérias. A característica importante do MLVA é que a análise de um número variado de *loci* refletirá num alto poder de discriminação, baseado na diversidade dentro de espécies bacterianas (VERGNAUND; POURCEL, 2009).

O objetivo do desenvolvimento da técnica de MLVA foi para satisfazer a necessidade de métodos de tipagem rápidos e confiáveis para uso em situações de surto de micro-organismos potencialmente patogênicos. Assim, com a combinação do polimorfismo dos VNTRs e o uso da metodologia de PCR, consegue-se atingir este objetivo (LINDSTEDT, 2005).

O método mais frequentemente utilizado para a análise é a eletroforese capilar, que é feita em aparelhos para sequenciamento de DNA. A precisão e a reprodutibilidade obtidas através da eletroforese capilar permitem a tipagem de unidades de repetição muito curtas. Essa técnica requer o uso de *primers* complementares às regiões das sequências VNTR marcados com diferentes fluoróforos. Dessa forma, faz-se possível a associação de diferentes produtos de PCR para analisar vários *loci* na mesma corrida e, conseqüentemente, reduz-se os custos (VERGNAUND; POURCEL, 2009). Pode-se utilizar até algumas dezenas de *loci* VNTR, mas em geral, o uso de cinco a oito *loci* já fornece resultados satisfatórios (GIERCZYNSKI et al., 2007).

A técnica de MLVA já foi utilizada eficientemente para a tipagem de muitos patógenos bacterianos, como *Bacillus anthracis* (KEIM et al., 2000), *Staphylococcus aureus* (SABAT et al., 2003), *Salmonella* Enteritidis (CAMPIONI et al., 2013), *Yersinia pestis*

(PORCEL et al., 2004), *Yersinia enterocolitica* (GIERCZYNSKI et al., 2007; SIHVONEN et al., 2011; VIRTANEN et al., 2013), entre outros.

1.4. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2

Dentre os biotipos patogênicos de *Y. enterocolitica*, o bio-sorogrupo 4/O:3 é o biotipo mais frequentemente isolado de humanos e animais doentes no mundo todo (FALCÃO et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007; FALCÃO et al., 2008; DRUMMOND et al., 2012). No entanto, existem trabalhos que relatam o isolamento de linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 em diversos países, e a maioria dos relatos de gastroenterite em humanos causada por essa bactéria estão associados a casos esporádicos (DRUMMOND et al., 2012; EFSA, 2013).

Favier, Escudero e Guzmán (2005) pesquisaram *Y. enterocolitica* na superfície de 352 ovos de galinhas durante o período de 2001 a 2003 na cidade de San Luis, Argentina. Neste estudo foram detectados oito linhagens (2,27%) de *Yersinia enterocolitica* bio-sorogrupo 2/O:9.

Num trabalho realizado por Ortiz Martínez e colaboradores (2010), foi feita a pesquisa de *Yersinia* em 630 porcos de 45 diferentes fazendas na Inglaterra, entre os anos de 2003 e 2005. Dentre as espécies de *Yersinia* encontradas, a prevalência de *Y. enterocolitica* foi de 44%, e os bio-sorogrupos mais comumente encontrados nesse estudo foram *Y. enterocolitica* biotipo 2/O:9 (33%) e *Y. enterocolitica* biotipo 2/O:5 (26%).

Y. enterocolitica foi pesquisada na Itália em 205 amostras de alimentos, sendo 125 de carne de porco e 80 de carne de galinha, entre os anos de 2006 e 2007. *Y. enterocolitica* foi isolada em 45 (21,9%) amostras, sendo que o isolamento de *Y. enterocolitica* biotipo 2 correspondeu a 5,6% do total de amostras positivas (BONARDI et al., 2010).

Fredriksson-Ahomaa, Stolle e Stephan (2007) pesquisaram a incidência de *Y. enterocolitica* em suínos provenientes de abatedouros da Suíça. Foram coletadas 212 amostras, e de um total de 72 amostras positivas de *Y. enterocolitica*, sete (9,7%) amostras foram detectadas como positivas para *Y. enterocolitica* biotipo 2, sendo seis pertencentes ao bio-sorogrupo 2/O:5,27 e uma ao bio-sorogrupo 2/O:9.

Na Suíça foi feito por Fredriksson-Ahomaa et al. (2012) um estudo longitudinal que analisou o isolamento de *Y. enterocolitica* em amostras clínicas isoladas de humanos, nos anos de 2001 a 2010. Durante esse período foram isoladas 128 linhagens de *Y. enterocolitica*, sendo que *Y. enterocolitica* biotipo 2 correspondeu a 26 (20%) linhagens desse total, e foi o segundo biotipo patogênico mais isolado.

De acordo com relatório anual da *European Food Safety Authority* (EFSA, 2013), no ano de 2011 foram relatados 7.017 casos de yersiniose em humanos nos países da União Europeia. Houve nesse ano um aumento de 3,5% de casos em relação ao ano anterior. *Y. enterocolitica* foi a espécie mais prevalente dentre as espécies de *Yersinia*, correspondendo a 98,4% dos casos confirmados. Esse relatório não enumera as linhagens de *Y. enterocolitica* quanto aos seus biotipos ou bio-sorogrupos, porém menciona que *Y. enterocolitica* biotipo 2 está presente entre as linhagens de *Y. enterocolitica* isoladas.

Um surto de origem alimentar causado por *Y. enterocolitica* biotipo 2 e veiculado por saladas prontas para o consumo foi relatado na Noruega no ano de 2011, onde 21 pessoas apresentaram gastroenterite após consumirem o alimento em questão (MACDONALD et al., 2012).

Como acima exposto, o isolamento de *Y. enterocolitica* biotipo 2 ocorre em diversos países. Entretanto o isolamento, bem como, o estudo dessa bactéria não são frequentes no Brasil (FALCÃO et al., 2004; FALCÃO et al., 2008). Dessa forma, o estudo de linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 ajudará a entender a diversidade genotípica, potencial patogênico e epidemiologia dessa espécie bacteriana isolada no país.

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Vários métodos moleculares têm sido utilizados na tipagem, nos estudos epidemiológicos e na caracterização do potencial patogênico de bactérias do gênero *Yersinia* (SOUZA et al., 2010; SIHVONEN et al., 2011; LUCERO ESTRADA et al., 2011; VIRTANEN et al., 2013). No entanto, o isolamento e o estudo de *Yersinia enterocolitica* não são muito frequentes no Brasil, o que dificulta avaliar a dimensão do envolvimento dessa bactéria como causadora de doença nos seres humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença no meio-ambiente (FALCÃO et al., 2004; FALCÃO et al., 2006; FALCÃO et al., 2008, CAMPIONI; FALCÃO, 2013).

Especificamente pelo nosso conhecimento não há estudos de tipagem molecular de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 realizados no Brasil. Há apenas um único estudo realizado no país com linhagens pertencentes a esse biotipo isoladas exclusivamente do ambiente em que a presença de alguns poucos genes de virulência foi pesquisada (FALCÃO et al., 2004). Além disso, estudos que correlacionam a tipagem molecular com os diversos biotipos de *Yersinia enterocolitica* também são escassos no país.

Dessa forma, estudos que caracterizem o potencial patogênico e a diversidade genotípica de linhagens desse biotipo isoladas no Brasil ajudarão no entendimento da epidemiologia, na caracterização do potencial patogênico e da diversidade genotípica de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas no país.

Assim, analisar a suscetibilidade a antimicrobianos, o potencial patogênico pela pesquisa de marcadores de virulência por PCR e por testes fenotípicos relacionados à virulência e tipar molecularmente pelas técnicas de ERIC-PCR, PFGE e MLVA as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de origens diversas isoladas no país contribuirão para uma melhor caracterização desse biotipo.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar o potencial patogênico, diversidade genotípica e suscetibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas de humanos, animal e ambiente.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2;
- Investigar o potencial patogênico das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 frente aos testes fenotípicos relacionados à virulência de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C, absorção do vermelho congo, atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina;
- Investigar o potencial patogênico das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 pela pesquisa dos marcadores de virulência *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *hreP*, *tccC*, *myfA* e *virF* por PCR;
- Verificar a similaridade genotípica entre as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 de diferentes origens por ERIC-PCR, PFGE e MLVA;
- Comparar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 com linhagens de *Yersinia enterocolitica* pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 3, 4 e 5 por ERIC-PCR, PFGE e MLVA;
- Avaliar o poder discriminatório de ERIC-PCR, PFGE e MLVA para as linhagens estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, sendo 34 de origem ambiental, cinco de origem humana e uma de origem animal. Para as técnicas de tipagem molecular e análises filogenéticas foram adicionadas 26 linhagens pertencentes aos outros biotipos de *Yersinia enterocolitica*, sendo 15 linhagens pertencentes ao biotipo 1A, duas linhagens pertencentes ao biotipo 1B, quatro linhagens pertencentes ao biotipo 3, quatro linhagens pertencentes ao biotipo 4 e uma linhagem pertencente ao biotipo 5, totalizando assim 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 3). Como linhagens controle positivo para a pesquisa dos marcadores de virulência por PCR foram utilizadas quatro linhagens de diferentes biotipos de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 4). Todas as linhagens pertencem à coleção de cultura do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis*, atualmente localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

A Tabela 3 traz de forma detalhada as informações quanto à origem, material, datas e locais de isolamento e bio-sorogrupos das 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

Tabela 3 - Características das 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas

Linhagens	Origem	Material	Data de recebimento	Local de isolamento	Bio-sorogrupo
IP 8396	Animal	Rato	1980	Chile	1A/O:7,8
IP 6883	Animal	Camundongo selvagem	1978	Chile	1A/O:7,8
FCF 2	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 3	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 4	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 5	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 6	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 7	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 10	Alimentos	Leite cru tipo B	1980	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 69	Alimentos	Leite	1982	Campinas	1A/O:14
FCF 387	Humana	Fezes normais	1985	Rio de Janeiro	1A/O:5
FCF 483	Alimentos	Leite cru	1991	São Paulo	1A/O:41,42
FCF 562	Alimentos	Leite pasteurizado	1997	Rio de Janeiro	1A/O:36
FCF 564	Alimentos	Leite pasteurizado	1997	Rio de Janeiro	1A/O:10
FCF 594	Alimentos	Cortes de frango	1998	Rio de Janeiro	1A/O:38
8081	Humana	SI	SI	Estados Unidos	1B/O:8

Continua

Continuação

Linhagens	Origem	Material	Data de recebimento	Local de isolamento	Bio-sorogrupo
FCF 197	Alimentos	Leite	1983	Araraquara	1B/O:7,8
IP 7661	Humana	Fezes diarreicas	1979	Rio de Janeiro	2/O:5
IP 7662	Humana	Fezes diarreicas	1979	Rio de Janeiro	2/O:5
IP 7663	Humana	Fezes diarreicas	1979	Rio de Janeiro	2/O:5
IP 7664	Humana	Fezes diarreicas	1979	Rio de Janeiro	2/O:5
IP 7665	Humana	Fezes diarreicas	1979	Rio de Janeiro	2/O:5
FCF 602	Animal	Fezes de capivara	1998	Botucatu	2/O:3
FCF 86	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 87	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 88	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 89	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 90	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 91	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 92	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 93	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 94	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 95	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 96	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 97	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 98	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 99	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 100	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 101	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 102	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 103	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 104	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 105	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 106	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 107	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 108	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 109	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 110	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 111	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 112	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 113	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 114	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 115	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 116	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 117	Ambiente	Água	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 127	Ambiente	Água de esgoto	1982	São Paulo	2/O:5,27

Continua

Conclusão

Linhagens	Origem	Material	Data de recebimento	Local de isolamento	Bio-sorogrupo
FCF 142	Ambiente	Água de esgoto	1982	São Paulo	2/O:5,27
FCF 123	Ambiente	Água de esgoto	1982	São Paulo	3/O:5,27
FCF 327	Ambiente	Água de oceano	1984	Rio de Janeiro	3/O:5,27
FCF 331	Ambiente	Água de oceano	1984	Rio de Janeiro	3/O:5,27
FCF 352	Humana	Mãos	1984	Rio de Janeiro	3/O:5,27
FCF 76	Humana	Fezes diarreicas	1982	Recife	4/O:3
FCF 380	Animal	Fezes diarreicas suino	1985	Londrina	4/O:3
FCF 384	Animal	Fezes diarreicas cão	1985	Rio de Janeiro	4/O:3
FCF 472	Humana	Fezes diarreicas	1991	Araraquara	4/O:3
CCUG 8232	Animal	Lebre	1979	Suécia	5/O:1,2,3

SI: sem informação

Tabela 4 - Características das quatro linhagens de *Yersinia enterocolitica* utilizadas como controle positivo na pesquisa dos marcadores de virulência por PCR

Amostra	Origem	Material	Data de recebimento	Local de isolamento	Bio-sorogrupo	Genes
FCF 60	Humano	Fezes diarreicas	1981	Pernambuco	4/O:3	<i>ail, myfA, inv</i>
FCF 119	Ambiente	Água de esgoto	1982	São Paulo	1A/O:27	<i>tccC</i>
IP 6884	Animal	Camundongo selvagem	1978	Chile	1A/O:7,8	<i>ystB, fepA, fepD, fes, hreP</i>
8081	Humana	SI	SI	Estados Unidos	1B/O:8	<i>inv, ail, ystA, virF</i>

SI: sem informação

4.2. Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica

A verificação da pureza e a reconfirmação bioquímica foram realizadas para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3, conforme descrito a seguir.

Para a reconfirmação da pureza, cada uma das linhagens foi cultivada em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) da marca Oxoid a 28°C por 24 horas. Para o isolamento, uma alçada de caldo BHI foi semeada por esgotamento em ágar MacConkey (Himedia) e incubada a 28°C por 24 horas. As colônias isoladas foram submetidas às provas para a verificação da pureza utilizando os meios TSI (*Triple Sugar Iron*), EPM, MILi e Citrato de Simmons (Difco).

A grande maioria das bactérias pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* pode ser identificada com fidelidade através dos testes bioquímicos dos meios EPM (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982a), MILi (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982b) e citrato de Simmons (BLAZEVIC; EDERER, 1975) e pelo teste de fermentação da lactose (FARMER

III et al., 1985) observado nos meios de isolamento que contém lactose, como os meios de ágar MacConkey e ágar *Salmonella-Shigella* (SS).

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

Após a verificação da pureza, as linhagens foram submetidas às provas para reconfirmação da espécie e dos biotipos conforme o descrito por Schrieffer e Petersen (2011).

4.3. Reconfirmação sorológica

A sorotipagem foi realizada por soro-aglutinação em lâmina para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3, de acordo com Wauters et al. (1991). Foi utilizado o crescimento de culturas incubadas a 28°C por 24 horas e anti-soros somáticos obtidos de coelhos, preparados no antigo Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia spp.* outras que *Y. pestis*, localizado anteriormente na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara.

4.4. Armazenamento das linhagens bacterianas

Após o isolamento, identificação e realização das provas para a reconfirmação bioquímica e sorológica, as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3 foram semeadas para estocagem em tubos contendo 3 mL do meio de cultura líquido BHI (Oxoid). Após incubação a 28°C por 24 horas, 1430 µL da suspensão bacteriana crescida em BHI foram acrescidos de 570 µL de glicerol 70%, obtendo uma concentração final de 20% de glicerol. Após homogeneização, os tubos foram estocados a -80°C.

Quando necessário, alíquotas das culturas armazenadas a -80°C foram inoculadas em caldo BHI, incubadas à temperatura de 28°C durante 24 horas e em seguida semeadas em ágar MacConkey pela técnica de esgotamento para a obtenção de colônias isoladas.

4.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3, de acordo com as normas de procedimento do CLSI 2012 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Após o crescimento em caldo BHI (Oxoid) a 28°C por 24 horas, as linhagens foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton (Acumedia) e incubadas a 28°C por 24 horas. A partir desse crescimento bacteriano, fez-se uma suspensão em salina 0,8% até que atingisse a escala 0,5 de MacFarland e com a utilização de um *swab* estéril, a suspensão foi semeada em placas de Petri de 20 x 150 mm contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia) para a formação do “tapete bacteriano”. Os discos de antibióticos (Cecon) foram colocados sobre as placas, e estas foram incubadas a 28°C por 24 horas e posteriormente fez-se a leitura dos halos de inibição. Os 14 antimicrobianos utilizados foram: amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg), amicacina (30 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepime (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacina (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sulfametoxazol - trimetoprima (25 µg) e tetraciclina (30 µg). A cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos discos de antibióticos utilizados.

4.6. Testes fenotípicos relacionados à virulência

4.6.1. Autoaglutinação a 37°C

O teste de autoaglutinação foi realizado segundo Farmer III et al. (1992), para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3. Cada linhagem foi semeada em duplicata em 2 mL de caldo Vermelho de Metila - Voges Proskauer (MR - VP - DIFCO), sendo que um dos tubos foi incubado a 28°C e o outro a 37°C por 24 horas.

O crescimento bacteriano em cada tubo foi analisado quanto à presença de sedimento espontâneo, indicado pela ausência de turvação do caldo e pela presença de um agregado bacteriano no fundo do tubo, quando observado contra a luz.

A amostra foi considerada positiva ou aglutinável quando o tubo incubado a 37°C apresentou as características descritas acima e o tubo incubado a 28°C não aglutinou.

4.6.2. Dependência ao cálcio a 37°C e absorção do corante vermelho congo

O teste de dependência ao cálcio a 37°C e absorção do corante vermelho congo foi realizado segundo Riley e Toma (1989), para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3.

Cada linhagem foi semeada em placa de ágar CR-MOX (Anexo III), visando a obtenção de colônias isoladas, e incubadas a 37°C por 24 e/ou 48 horas.

A leitura da placa foi realizada quanto à pigmentação e morfologia das colônias. O resultado foi considerado positivo quando as colônias se apresentaram pequenas (dependentes ao cálcio a 37°C) e vermelhas (absorveram o corante vermelho congo). Já o resultado foi considerado negativo quando as colônias se apresentaram grandes e incolores.

4.6.3. Atividade da enzima pirazinamidase

O teste da atividade da enzima pirazinamidase foi realizado segundo Kandolo e Wauters (1985), para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3. Cada linhagem foi semeada em ágar pirazinamidase (Anexo IV) e incubada a 28°C por 48 horas. A leitura foi realizada colocando-se sobre o crescimento bacteriano 1 mL de sulfato de ferro amoniacal a 1% e aguardando 15 minutos para a visualização de cor. O teste foi considerado positivo quando sobre o crescimento houve o aparecimento de uma cor que varia de rosa a vermelho.

4.6.4. Fermentação da salicina

O teste de fermentação da salicina foi realizado segundo Farmer III et al. (1992), para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3. Cada linhagem foi semeada em meio base contendo salicina a 1% (Anexo V) e a incubação foi feita a 28°C com leituras realizadas de 1 a 7 dias após a incubação. O teste foi considerado positivo quando o meio passou de amarelo claro para rosa, o que indica a acidificação do meio devido à fermentação da salicina.

4.6.5. Hidrólise da esculina

O teste de hidrólise da esculina foi realizado segundo Farmer III et al. (1992), para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3. Cada linhagem foi semeada em tubo contendo caldo esculina (Anexo VI) e incubada a 28°C com leituras realizadas de 1 a 7 dias após a incubação. Foi considerado como resultado positivo a

formação de um precipitado negro pela reação da esculetina, produto da hidrólise da esculina, com o citrato ferro amoniacal presente no meio.

4.7. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído de todas as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3, e das quatro linhagens de *Yersinia enterocolitica* (tabela 4) utilizadas como controle na pesquisa dos marcadores de virulência, segundo protocolo descrito por Falcão et al. (2006), e utilizado nos experimentos de pesquisa dos marcadores de virulência por PCR, ERIC-PCR e MLVA.

As linhagens foram crescidas em 4 mL de caldo BHI e incubadas a 28°C por 24 horas. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação (14000 rpm por 3 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf) e o sedimento foi suspenso em 250 µL de solução I (20% de sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM EDTA) a 4°C.

Após 10 minutos em gelo, as células foram lisadas com 500 µL de solução II (50 mM NaCl, 1% sarcosil) adicionados de 0,05 mg/mL de proteinase K. Em seguida, incubou-se em banho de água a 37°C por 2 horas.

Posteriormente, as linhagens foram submetidas à purificação do DNA genômico com 750 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 750 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 1 mL de etanol a 4°C e mantido em gelo *overnight*.

No dia seguinte, o DNA foi sedimentado por centrifugação (4°C/14000 rpm/60 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em “*Speed Vac*” (Concentrator 5301, Eppendorf) e posteriormente, suspenso em 400 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen). Aos 400 µL de suspensão de DNA, foram adicionados 2 µL de RNase 50 µg/mL e incubados em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi avaliada em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. A 5 µL do DNA extraído foram adicionados 3 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 até o marcador azul de bromofenol alcançar aproximadamente metade do gel. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos e observado em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrado em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

A concentração e a pureza do DNA genômico extraído foram analisadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV MINI 1240, SHIMADZU) com comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Foram consideradas como boas as extrações de pureza entre 1,65 e 1,9 (A_{260nm}/A_{280nm}), uma vez que esses valores demonstram que a amostra de DNA está com baixo nível de impurezas. Para amostras acima ou abaixo desses valores, uma nova extração do DNA genômico foi realizada.

4.8. Pesquisa dos marcadores relacionados à virulência por PCR

A pesquisa dos marcadores relacionados à virulência por PCR foi realizada para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3. Os DNAs genômicos utilizados na PCR foram extraídos e quantificados como descrito no item 4.7. A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume final de 50 µL. A Tabela 5 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a amplificação dos marcadores de virulência.

Tabela 5 - Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos marcadores de virulência por PCR

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10x Tampão "PCR Buffer" ^a	5	1x
10 mM "dNTP Mixture" ^a	1	0,2 mM de cada dNTP
<i>Primer forward</i>	2,5	25 pmol
<i>Primer reverse</i>	2,5	25 pmol
50 mM MgCl ₂ ^a	2	2 mM
DNA Genômico (10 ng/µL)	5	50 ng
Taq DNA Polimerase ^a 2U	0,5	1U
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-50	_____

^a Produto Invitrogen

Os genes pesquisados foram *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC* e *hreP*, cujas sequências dos *primers* utilizados estão na Tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* utilizados na PCR para amplificação dos genes *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC* e *hreP*, tamanho dos produtos de amplificação gerados e temperatura de hibridação

Genes	Primers	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')	Amplicon (pb)	Temp. (°C)	Referências
hibridação					
<i>inv</i>	YC1	CTG TGG GGA GAG TGG GGA AGT TTG G	570	61	Rasmussen et al., 1994
	YC2	GAA CTG CTT GAA TCC CTG AAA ACC G			
<i>ail</i>	Ail1	ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG	170	55	Nakajima et al., 1992
	Ail2	CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG			
<i>ystA</i>	Pr2a	AAT GCT GTC TTC ATT TGG AGC A	145	60	Ibrahim et al., 1997
	Pr2c	ATC CCA ATC ACT ACT GAC TTC			
<i>ystB</i>	Ystb-F	GTACATTAGGCCAAGAGACG	146	61	Thoerner et al., 2003
	Ystb-R	GCAACATACCTCACAACACC			
<i>virF</i>	VirF1	TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG	590	58	Wren; Tabaqchali, 1990
	VirF2	ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG			
<i>myfA</i>	myfA1	CAG ATA CAC CTG CCT TCC ATC T	272	58	Kot; Trafny, 2004
	myfA2	CTC GAC ATA TTC CTC AAC ACG C			
<i>fepA</i>	fepA1	TAC GCC AAA ATA CCT TAC GAT	438	54	Schubert et al., 1999
	fepA2	TGT AAA TAC ACC CCC ACC TGA			
<i>fepD</i>	fepD1	GTG TGA TTG CCT TAC TAT TG	381	53	Schubert et al., 1999
	fepD2	CGG TCA TCC TTT TAT TAC GG			
<i>fes</i>	fes1	GCC GGC AGG CAC AGC GTA AT	561	64	Schubert et al., 1999
	fes2	GGC CAA CCC ACC CAA AAC TT			
<i>tccC</i>	tccC1	GGG CAA AAA ATG CGT GAA GAG AG	1035	67	Bhagat; Viridi, 2007
	tccC2	TTT ACC GGA ATA ACG CAC AGT TTT A			
<i>hreP</i>	hreP1	GCC GCT ATG GTG CCT CTG GTG TG	757	68	Bhagat; Viridi, 2007
	hreP2	CCC GCA TTG ACT CGC CCG TAT C			

Reações sem DNA foram usadas como controle negativo.

O termociclador utilizado para os experimentos foi o Mastercycler da marca Eppendorf.

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 45 segundos.
- Hibridação dos *primers*: X°C por 45 segundos.
- Extensão: 72°C por 1 minuto.

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

A temperatura X°C foi estabelecida de acordo com a temperatura de hibridação dos *primers* de cada um dos 11 genes pesquisados, sendo de 61°C (*inv*), 55°C (*ail*), 60°C (*ystA*),

61°C (*ystB*), 58°C (*virF*), 58°C (*myfA*), 54°C (*fepA*), 53°C (*fepD*), 64°C (*fes*), 67°C (*tccC*) e 68°C (*hreP*).

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TAE 1X. O marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder - Invitrogen foi aplicado ao gel e a eletroforese foi conduzida a 80 volts por 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.9. Amplificação das sequências ERIC

As sequências ERIC foram amplificadas para todas as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3.

A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume final de 50 µL e seguiram as condições descritas por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991), com algumas modificações. Os *primers* utilizados foram: ERIC1R: (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2: (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'). A Tabela 7 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a realização da técnica de ERIC-PCR.

Tabela 7 - Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de ERIC-PCR

Componentes	Volume (µL)
10x Tampão "PCR Buffer" ^b	5
10 mM "dNTP Mixture" ^a	2
ERIC 1R (10 pmol/µL)	2
ERIC 2 (10 pmol/µL)	2
50 mM MgCl ₂ ^a	3
DNA Genômico (10 ng/µL)	10
Klen Taq1™ DNA Polimerase (1U/µL) ^b	2
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-50

^a Produto Invitrogen; ^b Produto Ab Peptides

O termociclador utilizado para o ensaio de ERIC-PCR foi o Mastercycler da marca Eppendorf.

As condições das reações de amplificação foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 30 segundos.

- Hibridação dos *primers*: 52°C por 1 minuto.
- Extensão: 65°C por 8 minutos.

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 65°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação de ERIC-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% e a eletroforese foi conduzida a 70 volts por 3,5 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 30 minutos e observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

As reações de PCR foram feitas em duplicata para verificar a reprodutibilidade das reações de amplificação.

4.9.1. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de ERIC-PCR

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium). Para o ensaio de ERIC-PCR, somente as bandas entre 300 e 5000 pb em tamanho foram incluídas na análise. Um padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen) foi incluído três vezes em cada gel com o intuito de normalizar as imagens para a validação da técnica de ERIC-PCR nos diferentes géis.

4.9.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de ERIC-PCR

A construção do dendrograma de similaridade genômica entre as linhagens foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium) utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, segundo as instruções do manual do programa.

4.10. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

4.10.1. Preparo das amostras

O ensaio de PFGE foi feito seguindo o protocolo do PulseNet para *Yersinia pestis*, com algumas modificações. Foi realizado para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3.

As linhagens foram crescidas em caldo BHI (Oxoid) a 28°C por 24 horas. Em seguida foram semeadas em placas contendo ágar TSA (*tryptone soya agar*) da marca Himedia e

incubadas a 28°C durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado a 3,0 mL de tampão de suspensão de células (100 mM Tris; 100 mM EDTA) até que atingisse uma D.O._{610nm} de 1,35 (faixa de 1,30 a 1,40). Em seguida, 200 µL dessa suspensão de células foram transferidos para um tubo plástico cônico de 2,0 mL e colocados em gelo para cessar o crescimento bacteriano. A cada tubo contendo a suspensão de células, foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e então os tubos foram colocados em banho seco a 60°C. Em seguida foram adicionados 200 µL de agarose 1% *Seakem Gold* (Lonza): 1% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) (USB) em cada tubo e aproximadamente 70 µL da mistura foram transferidos para cada poço do molde apropriado para a confecção dos *plugs* de agarose.

Após a solidificação dos *plugs*, estes foram transferidos para tubos de prolipropileno de fundo cônico de 15 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8,0; 1% Sarcosil) e 25 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubados em banho de água a 54°C por duas horas. Após isso, os tubos foram agitados em agitador por 30 minutos. Em seguida, o tampão de lise celular foi removido e os *plugs* foram lavados duas vezes com 10 mL de água MilliQ pré-aquecida a 50°C por 15 minutos cada lavagem. Posteriormente às lavagens com água MilliQ, os *plugs* foram lavados quatro vezes com 10 mL de tampão de lavagem TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) pré-aquecido a 50°C por 15 minutos cada lavagem. Após o término das lavagens, os *plugs* foram estocados em 1 mL de tampão de lavagem TE em tubo plástico cônico de 2 mL a 4°C.

4.10.2. Digestão dos *plugs*

A digestão dos *plugs* foi feita separando-se 1 *plug* em um tubo plástico cônico de 2,0 mL, seguido de três lavagens por 15 minutos com tampão de lavagem TE pré-aquecido a 50°C. Em seguida foram adicionados 300 µL do tampão comercial da enzima 1X e os tubos foram lavados sob leve agitação por 30 minutos. Após isso, 30 unidades da enzima *Xba*I (Invitrogen) foram adicionados ao tampão e os *plugs* foram incubados por 12-18 horas em banho de água a 37°C.

4.10.3. Corrida eletroforética

Após a digestão, o tampão com a enzima foi removido e 300 µL de tampão TBE (1 mM EDTA, pH 8,0; 45 mM Tris; 45 mM ácido bórico) 0,5X foram adicionados e os *plugs* foram lavados sob leve agitação por 10 minutos. Em seguida, estes foram transferidos para um gel de agarose *Seakem Gold* 1% preparado com TBE 0,5X, selados com uma fina camada

de agarose *Seakem Gold* 1% e submetidos à corrida no aparelho CHEF-DRIII System (Bio-Rad), sob as condições de corrida descritas por Guiyoule et al. (1997):

- Tempo de corrida: 29 horas
- Voltagem: 6 V/cm
- Pulso inicial: 1 segundo
- Pulso final: 10 segundos
- Ângulo: 120°
- Temperatura da corrida: 14°C

Após as corridas, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/mL) por 30 minutos, descorados em água MilliQ por 60 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.10.4. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de PFGE

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium). Para a técnica de PFGE, somente as bandas entre 48,5 e 242,5 Kb em tamanho foram incluídas na análise. Um padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker - New England) foi incluído três vezes em cada gel com o intuito de normalizar as imagens para a validação da técnica nos diferentes géis obtidos na técnica de PFGE.

4.10.5. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE

A construção do dendrograma de similaridade genômica entre as linhagens foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium) utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, segundo as instruções do manual do programa.

4.11. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

A técnica do MLVA foi realizada para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3.

A determinação dos VNTRs foi realizada em duas reações de PCR multiplex, utilizando reagentes para o volume final de 25 μL e seguiram as condições descritas por Sihvonen et al. (2011), com algumas modificações. Foram pesquisados seis *loci* VNTR, V2A, V4, V5, V6, V7 e V9, como descrito por Gierczynski et al. (2007). As Tabelas 8 e 9 trazem de forma detalhada os reagentes utilizados nas duas reações de PCR multiplex para a realização da técnica de MLVA.

Tabela 8 - Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos *loci* V2A, V4 e V6

Componentes	Volume (μL)
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix ^a	12,5
<i>primers forward</i> V2A, V4 e V6	1,4 ^c
<i>primers reverse</i> V2A, V4 e V6	1,4 ^c
5x Q-solution	5
DNA genômico (10 ng/ μL)	4
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^b	q.s.p.-25

^a Produto Qiagen; ^b Produto Invitrogen; ^c *primers* V2A (0,5 μL), V4 (0,4 μL), V6 (0,5 μL)

Tabela 9 - Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos *loci* V5, V7 e V9

Componentes	Volume (μL)
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix ^a	12,5
<i>primers forward</i> V5, V7 e V9	1,3 ^c
<i>primers reverse</i> V5, V7 e V9	1,3 ^c
5x Q-solution	5
DNA genômico (10 ng/ μL)	4
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^b	q.s.p.-25

^a Produto Qiagen; ^b Produto Invitrogen; ^c *primers* V5 (0,5 μL), V7 (0,5 μL), V9 (0,3 μL)

Os *primers forward* utilizados foram marcados na extremidade 5' com diferentes fluoróforos. A Tabela 10 traz os *primers* utilizados bem como a região VNTR pesquisada.

Tabela 10 - *Primers* utilizados na PCR para amplificação dos VNTRs

Locus	Loci VNTR	Primers	Sequência dos primers (5' - 3')
V2A	TCTCAC	V2A.F V2A.R	PET - CAG CGC TTC TTT ATT TGC TGC GCG TTA TCT ACC TGA TGG TGC
V4	CGGCAAC	V4.F V4.R	NED - GTC ACA TTG GCC TTA ATC ACC TCG TAC TCA ATT TCC TGA TGC
V5	GGTGCA	V5.F V5.R	NED - ACA GTT ATT GCA AGA GAT GGG AAC TGG TTG AAC TAG AAC ACC
V6	GACTCA	V6.F V6.R	6-FAM - ATT GCT CTG CGG TGT ATT ACG CTT CTC GGC GAT CCA GAA GCC
V7	GTGCTG	V7.F V7.R	VIC - CCA TAA TCT AGA CCT CTT TGG AGA ATT CGT TGG CCT GTT TGG
V9	ATGTCGGTAGAA	V9.F V9.R	PET - AGG GTA TTC ATG CAC AGA AGC ATG GCT AAA ATA CGT TCA GCC

Fonte: Gierzynski et al. 2007. F - *forward*; R - *reverse*.

Reações sem DNA foram usadas como controle negativo.

O termociclador utilizado para o ensaio de PCR foi o *DNA Engine Peltier Thermal Cycler* da Marca BioRad.

As condições das reações de amplificação foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 30 segundos
- Hibridação dos *primers*: 58°C por 1 minuto
- Extensão: 72°C por 1 minuto

Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Após isso, as multiplex PCRs referentes a cada linhagem foram misturadas e diluídas 1:10 v/v. Um volume de 1,5 µL dessa diluição foi acrescido de 10 µL de HiDi Formamida (Applied Biosystem) e 0,5 µL do marcador de peso molecular GeneScan-1200 LIZ[®] *Size Standard* (Applied Biosystem). Em seguida foi feita a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500xl (Applied Biosystem) utilizando filtro G5 e matriz DS-33, de acordo com as instruções do fabricante.

4.11.1. Análise dos picos gerados com os dados da eletroforese capilar

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium). Cada pico gerado foi identificado de acordo com o

tamanho e a marcação utilizada. O tamanho dos fragmentos e consequentemente o número de repetições de cada *loci* VNTR foi convertido em números para a construção do dendrograma.

4.11.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de MLVA

A construção do dendrograma de similaridade genômica entre as linhagens foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Keistraat, Belgium) utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice *categorical values*, segundo as instruções do manual do programa.

4.12. Cálculo do índice de discriminação

Para o cálculo do índice de discriminação das metodologias de tipagem molecular utilizadas no presente trabalho, foi utilizada uma variação do índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949). O índice de discriminação (D) utilizado (HUNTER; GASTON, 1988) baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$D = 1 - [1/N(N-1)] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Onde N representa o número total de linhagens estudadas, s é o número total de tipos obtidos no dendrograma e n_j é o número de amostras que pertencem ao tipo j .

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Verificação da pureza e reconfirmação bioquímica

As 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas foram reconfirmadas quanto aos seus biotipos conforme especificado na Tabela 3.

5.2. Reconfirmação sorológica

Todas as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas apresentaram o mesmo antígeno somático (O) como previamente determinado e especificado na Tabela 3.

5.3. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O perfil de resistência a antimicrobianos das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas está apresentado na Tabela 11.

As linhagens de humanos e animal foram sensíveis a todos os 14 antimicrobianos testados. Dentre as 34 linhagens de ambiente estudadas, 27 (79,4%) se apresentaram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e sete (20,6%) linhagens foram resistentes a um ou dois antimicrobianos.

Tabela 11 - Perfil de resistência aos antimicrobianos amoxicilina + ácido clavulânico, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol - trimetoprima e tetraciclina das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas

Antimicrobiano	Linhagem	Origem
SUT	FCF 86	Ambiente
AMI, GEN	FCF 88	Ambiente
GEN	FCF 90	Ambiente
AMI	FCF 93	Ambiente
CFO, SUT	FCF 96	Ambiente
AMI, GEN	FCF 100	Ambiente
AMI, CFO	FCF 105	Ambiente

AMI: amicacina, CFO: cefoxitina, GEN: gentamicina, SUT: sulfametoxazol - trimetoprima

5.4. Testes fenotípicos relacionados à virulência

A Tabela 12 traz as características das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas e listadas na Tabela 3, frente aos testes fenotípicos de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C, absorção do vermelho congo, atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina.

Do total de 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas, três (7,5%) foram positivas para os testes fenotípicos de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C e absorção do vermelho congo, sendo duas linhagens de origem humana e uma linhagem de origem animal.

Todas as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentaram comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos de atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina.

Tabela 12 - Características fenotípicas relacionadas à virulência das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas

Testes fenotípicos	Número de linhagens com comportamento relacionado à virulência positivo (%)		
	Ambiente n=34	Animal n=1	Humano n=5
Expressão de gene plasmidial			
Autoaglutinação a 37°C	0	1 (100)	2 (40)
Dependência ao cálcio a 37°C	0	1 (100)	2 (40)
Absorção do vermelho congo	0	1 (100)	2 (40)
Outros testes fenotípicos			
Atividade da pirazinamidase	34 (100)	1 (100)	5 (100)
Hidrólise da esculina	34 (100)	1 (100)	5 (100)
Fermentação da salicina	34 (100)	1 (100)	5 (100)

5.5. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada através de uma eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% para todas as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* listadas na Tabela 3, bem como para as linhagens de *Yersinia enterocolitica* utilizadas como controle positivo na pesquisa dos marcadores de virulência (Tabela 4). A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese para a avaliação da integridade do DNA genômico.

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

Figura 1 - Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18, linhagens representativas de *Yersinia enterocolitica* estudadas: IP 6883 (1), FCF 10 (2), FCF 387 (3), FCF 197 (4), IP 7661 (5), IP 7663 (6), IP 7664 (7), FCF 602 (8), FCF 88 (9), FCF 89 (10), FCF 90 (11), FCF 112 (12), FCF 127 (13), FCF 142 (14), FCF 123 (15), FCF 331 (16), FCF 76 (17), FCF 384 (18).

5.6. Pesquisa dos marcadores de virulência por PCR

A Tabela 13 representa a frequência dos marcadores de virulência pesquisados para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3.

Todas as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentaram os genes *inv*, *ail*, *ystA*, *hreP*, *tccC* e *myfA*. Os genes *fepD* e *fes* foram detectados em 39 (97,5%) linhagens, sendo 34 (100%) linhagens de origem ambiental e cinco (100%) linhagens de origem humana. O gene *virF* foi encontrado em três (7,5%) linhagens, sendo duas (40%) linhagens de origem humana e uma (100%) linhagem de origem animal. Os genes *ystB* e *fepA* não foram detectados em nenhuma das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas.

Tabela 13 - Frequência dos marcadores de virulência pesquisados para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas

Genes	Número de linhagens positivas (%)		
	Ambiente n=34	Animal n=1	Humano n=5
<i>inv</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>ail</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>ystA</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>hreP</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>tccC</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>myfA</i>	34 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>fepD</i>	34 (100)	0	5 (100)
<i>fes</i>	34 (100)	0	5 (100)
<i>virF</i>	0	1 (100)	2 (40)
<i>ystB</i>	0	0	0
<i>fepA</i>	0	0	0

5.7. Amplificação das sequências ERIC

A Figura 2 traz um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualização dos produtos de PCR gerados pelo ensaio de ERIC-PCR para algumas das linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

Figura 2 - Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 16, linhagens representativas de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas: FCF 100 (1,2), FCF 101 (3,4), FCF 102 (5,6), FCF 103 (7,8), FCF 104 (9,10), FCF 105 (11,12), FCF 106 (13,14), FCF 107 (15,16).

A amplificação das sequências ERIC foi feita em duplicata para cada uma das linhagens estudadas e o mesmo padrão de bandas foi encontrado para cada replicata (Figura 2). O padrão de bandas gerado variou entre 18 e 26 bandas em número e entre 300 pb e 5000 pb em tamanho.

5.7.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de ERIC-PCR

A análise do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3 gerou um dendrograma de similaridade genética, apresentado na Figura 3.

O dendrograma de similaridade genética permitiu a visualização de um grande grupo denominado A e de quatro grupos menores denominados B, C, D e E. No grupo A ficaram agrupadas 26 linhagens, provenientes de ambiente (23) e de humanos (3), com 90,6% de similaridade entre si. No grupo B ficaram cinco linhagens de origem ambiental, com 91,2% de similaridade entre si. A similaridade genética entre os grupos A e B foi maior que 89,8%. No grupo C ficaram três linhagens de origem ambiental, com 92,8% de similaridade entre si e com similaridade superior a 89,2% em relação aos outros grupos. No grupo D ficaram quatro linhagens, provenientes de ambiente (3) e animal (1), com 92,1% de similaridade entre si e com similaridade superior a 88,3% em relação aos outros grupos. O Grupo E foi o menor grupo com apenas 2 linhagens de humanos, com 93,6% de similaridade entre si. A similaridade genética das linhagens dos grupos A, B, C e D foi maior que 88,3% e desses quatro grupos com o grupo E foi maior que 84,7%. Não foi observada uma correlação epidemiológica entre os materiais analisados, os anos de isolamento e os grupos obtidos. A metodologia de ERIC-PCR diferenciou as linhagens em 37 ERIC tipos distintos (Figura 3).

Na tentativa de comparar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 aos outros biotipos pertencentes a essa espécie, a metodologia de ERIC-PCR também foi realizada com a adição de 26 linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 3, 4 e 5 gerando assim um dendrograma de similaridade genética, apresentado na Figura 4, com as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 3). O dendrograma de similaridade genética permitiu a visualização de três grupos denominados F, G e H. No grupo F ficaram todas as linhagens pertencentes ao biotipo 1A, com 76,2% de similaridade entre si. No grupo G ficaram as linhagens pertencentes aos biotipos 2, 3, 4 e 5, com similaridade maior que 84,8% entre si. No

grupo H ficaram as linhagens pertencentes ao biotipo 1B, com similaridade de 81,0% entre si. Os três grupos apresentaram similaridade superior a 73,3% (Figura 4).

Figura 3 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas.

Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

5.8. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

A Figura 5 traz um gel representativo após eletroforese em campo pulsado de algumas linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

O padrão de bandas variou em número entre 20 e 28 bandas, e somente as bandas de peso molecular entre 48,5 Kb e 242,5 Kb foram consideradas na análise.

Figura 5 - Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas digeridas com a enzima *XbaI*. M: marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker - New England). Canaletas de 1 a 10, linhagens representativas de *Yersinia enterocolitica* estudadas: IP 7661 (1), IP 7662 (2), IP 7663 (3), IP 7664 (4), IP 7665 (5), FCF 123 (6), FCF 127 (7), FCF 142 (8), FCF 380 (9), FCF 483 (10).

5.8.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE

A Figura 6 ilustra o dendrograma de similaridade genética gerado a partir da análise do perfil de bandas de PFGE para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3.

O dendrograma de similaridade genética permitiu a visualização de três grupos denominados I, J e K. No grupo I ficaram agrupadas 21 linhagens, provenientes de ambiente (20) e de animal (1), com 86,1% de similaridade entre si. No grupo J ficaram oito linhagens, sendo três de origem ambiental e cinco de humano, com 89,4% de similaridade entre si. A maioria das linhagens está nos grupos I e J que apresentaram similaridade genética maior que 78,3%. No grupo K ficaram 11 linhagens de origem ambiental, com 87,2% de similaridade entre si e com similaridade superior a 70,0% em relação aos outros grupos. Não foi observada uma correlação epidemiológica entre os materiais analisados, os anos de isolamento e os grupos obtidos. A metodologia de PFGE diferenciou as linhagens em 25 PFGE tipos distintos (Figura 6).

Para a comparação entre as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 com as linhagens dos outros biotipos pertencentes a essa espécie, a metodologia de PFGE também foi realizada com a adição de 26 linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 3, 4 e 5 gerando assim um dendrograma de similaridade genética, apresentado na Figura 7, com as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 3).

O dendrograma de similaridade genética com as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* permitiu a visualização de três grupos denominados L, M e N. No grupo L ficaram nove linhagens pertencentes ao biotipo 1A, com 46,3% de similaridade entre si. No grupo M ficaram cinco linhagens pertencentes ao biotipo 1A e uma linhagem pertencente ao biotipo 1B, com similaridade de 57,1% entre si. No grupo N ficaram todas as linhagens pertencentes aos biotipos 2, 3, 4 e 5, uma linhagem pertencente ao biotipo 1A e uma linhagem pertencente ao biotipo 1B, com similaridade de 57,8% entre si. Os três grupos apresentaram similaridade superior a 43,7% (Figura 7).

Figura 6 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas.

Figura 7 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

5.9. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

5.9.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de MLVA

A análise dos picos gerados e a obtenção do número de repetições de cada um dos VNTRs pesquisados para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 listadas na Tabela 3 gerou um dendrograma de similaridade genética, apresentado na Figura 8. Por definição do programa BioNumerics, a ausência do VNTR foi determinada com o valor numérico -2,0. Foram pesquisados seis VNTRs, porém o VNTR V7 não amplificou para a maioria das linhagens estudadas, e por isso, esse VNTR foi retirado da análise.

O dendrograma de similaridade genética permitiu a visualização de dois grupos denominados O e P. No grupo O ficaram agrupadas cinco linhagens isoladas de humanos, com 60,0% de similaridade entre si. No grupo P ficaram agrupadas 32 linhagens isoladas do ambiente, com 60,0% de similaridade entre si. A similaridade genética entre as linhagens dos grupos O e P foi maior que 37,7%. Três linhagens não se agruparam a esses três grupos, a FCF 96 e FCF 104, ambas isoladas do ambiente e a FCF 602 isolada de animal. A metodologia do MLVA diferiu as linhagens em 7 MLVA tipos distintos (Figura 8).

Na comparação entre as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 com as linhagens dos outros biotipos pertencentes a essa espécie, a metodologia do MLVA também foi realizada com a adição de 18 linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 3, 4 e 5 gerando assim um dendrograma de similaridade genética, apresentado na Figura 9, com 58 linhagens de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 3), exceto as linhagens FCF 2, FCF 5, FCF 6, FCF 7, FCF 10, FCF 69, FCF 562 e FCF 564, todas pertencentes ao biotipo 1A, que não amplificaram nenhum dos seis VNTRs pesquisados e foram excluídas desta análise. O dendrograma de similaridade genética gerado com as 58 linhagens de *Yersinia enterocolitica* permitiu a visualização de três grupos denominados Q, R e S. No grupo Q ficaram agrupadas três linhagens pertencentes ao biotipo 4 com 40,0% de similaridade entre si. No grupo R ficaram agrupadas 44 linhagens pertencentes aos biotipos 2, 3 e 4 com similaridade de 42,1% entre si. No grupo S ficaram agrupadas 9 linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2, e 5, com similaridade de 24,0% entre si. Os três grupos apresentaram similaridade superior a 8,0%. Duas linhagens não se agruparam a esses três grupos, a FCF 3 e FCF 4, pertencentes ao biotipo 1A, que apresentaram uma similaridade superior a 16,2% em relação aos grupos Q e R (Figura 9).

Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas.

Figura 9 - Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 58 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas.

5.10. Índice de discriminação

O índice de discriminação (D) da metodologia de ERIC-PCR para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 foi de 0,996 e para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* dos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 (Tabela 3) foi de 0,998. Na metodologia de PFGE o índice de discriminação para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 foi de 0,965 e para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* dos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 (Tabela 3) foi de 0,981. Já para a metodologia do MLVA, o índice de discriminação para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 foi de 0,655 e para as 58 linhagens de *Yersinia enterocolitica* dos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 (item 5.9.1) foi de 0,82.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Dentre as espécies de *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica* é a mais prevalente como causa de doenças em humanos (DRUMMOND et al., 2012). A doença causada por *Yersinia enterocolitica* é denominada yersiniose e ocorre, sobretudo, pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados por esta bactéria (ROBINS-BROWNE, 2001).

Para que *Yersinia enterocolitica* possa causar doença é necessário uma série de marcadores de virulência que são codificados tanto por genes cromossomais quanto por genes plasmidiais contidos no plasmídeo pYV (ROBINS-BROWNE, 2001).

No presente estudo foram pesquisados nas 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, 11 marcadores de virulência por PCR, sendo 10 genes cromossomais *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*, *myfA*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC* e *hreP* e um gene plasmidial *virF*.

As 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentaram os genes *inv*, *ail*, *ystA*, *hreP*, *tccC* e *myfA*. Os genes *fepD* e *fes* foram detectados em 39 (97,5%) linhagens. O gene *virF* foi encontrado em três (7,5%) linhagens e os genes *ystB* e *fepA* não foram detectados em nenhuma das 40 linhagens estudadas (Tabela 13).

O gene *inv* foi encontrado em 100% das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas, o que corrobora com os dados da literatura que relatam que este gene encontra-se em todas as espécies de *Yersinia*, entretanto, é funcional apenas nas linhagens patogênicas (CARNIEL, 1995).

No nosso estudo, apenas três (7,5%) linhagens, sendo duas linhagens de origem humana e uma linhagem de origem animal, amplificaram o gene *virF*. A ausência deste gene em 37 (92,5%) linhagens pode ser explicada devido ao fato deste gene ser plasmidial, e com sucessivos repiques e procedimentos laboratoriais, a bactéria possa expulsar e, portanto perder o plasmídeo que contem o gene *virF* (CORNELIS et al., 1998).

Lucero Estrada e colaboradores (2011) avaliaram a presença dos marcadores de virulência *ail*, *ystA*, *myfA* e *virF* em nove linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2. Todas as linhagens apresentaram os genes *ail*, *ystA* e *myfA* e seis linhagens apresentaram o gene *virF*. A presença do gene *virF* foi também confirmada pelos testes fenotípicos relacionadas a virulência, dependência ao cálcio a 37°C, autoaglutinação a 37°C e absorção do vermelho congo. Assim, esses dados corroboram com os dados do nosso estudo, uma vez que foi notada uma grande ocorrência dos marcadores de virulência *ail*, *ystA* e *myfA* nas linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2.

O trabalho realizado por Zheng et al. (2008) também está de acordo com os nossos resultados, pois 39 (100%) linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 apresentaram os genes *inv*, *ail* e *ystA*.

A presença de marcadores de virulência em linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 também foi por realizada por Thoerner e colaboradores (2003). Todas as 44 linhagens estudadas neste trabalho amplificaram os genes *ystA* e *ail*, 29 (66%) linhagens amplificaram o gene *virF* e nenhuma das linhagens estudadas amplificou o gene *ystB*.

Assim como no trabalho de Thoerner e colaboradores (2003), no nosso estudo nenhuma das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentou o gene *ystB*. Um estudo realizado por Bhagat e Viridi (2007) demonstrou que o gene *ystB* é bastante prevalente em linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A, mas não em outros biotipos, o que foi corroborado com linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 nos estudos acima mencionados.

Todas as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentaram comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos de atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina (Tabela 12). Esse resultado já era esperado, uma vez que, somente as linhagens patogênicas de *Yersinia enterocolitica* pertencentes aos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 se comportam dessa maneira frente a estes testes fenotípicos, em contraposição às linhagens pertencentes ao biotipo 1A que são consideradas não patogênicas (KANDOLO E WAUTERS, 1985; FARMER III et al., 1992).

No presente estudo, três linhagens apresentaram o gene *virF* e somente estas foram positivas para os testes fenotípicos de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C e absorção do vermelho congo, que são testes relacionados à presença do plasmídeo pYV. Isso mostra a relação entre a presença do plasmídeo e a positividade para estes testes fenotípicos (RILEY; TOMA, 1989; BHADURI; SMITH, 2011). Esses dados corroboram com os trabalhos de Lucero Estrada et al. (2011) e Zheng et al. (2008), nos quais somente as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 que apresentaram o gene plasmidial *virF* foram positivas para os testes fenotípicos citados.

Assim, de acordo com o exposto, pode-se dizer que a presença da maioria dos marcadores de virulência e o comportamento frente aos testes fenotípicos relacionados à virulência realizados, evidenciam o potencial patogênico das linhagens de *Y. enterocolitica* biotipo 2 estudadas no presente trabalho.

A gastroenterite causada por *Yersinia enterocolitica* em pacientes imunocompetentes é autolimitada e dispensa o uso de antimicrobianos, necessitando apenas de reposição eletrolítica. Entretanto, infecções sistêmicas e pacientes imunocomprometidos devem ser tratados com antibioticoterapia. Assim, quando a antibioticoterapia faz-se necessária, os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento são sulfametoxazol - trimetoprima, aminoglicosídeos e fluoroquinolona (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011; FÁBREGA; VILA, 2012).

No nosso estudo, o teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi feito pelo teste de disco difusão utilizando os antimicrobianos amoxicilina + ácido clavulânico, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol - trimetoprima e tetraciclina. A maioria das linhagens (82,5%) apresentou-se suscetível aos antimicrobianos testados e somente sete linhagens (17,5%) apresentaram resistência a um ou dois antimicrobianos, sendo essas linhagens isoladas do ambiente. As linhagens isoladas de humanos e animal foram suscetíveis a todos os 14 antimicrobianos testados.

As linhagens ambientais que foram resistentes apresentaram resistência a cefoxitina, amicacina, gentamicina e sulfametoxazol - trimetoprima (Tabela 11). Uma vez que, aminoglicosídeos e sulfametoxazol - trimetoprima são os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento, a resistência a esses antimicrobianos pode acarretar numa falha do tratamento.

Pham et al. (2000) investigaram a resistência a antimicrobianos de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas na França, Estados Unidos, Reino Unido, Japão e Austrália. Fredriksson-Ahomaa, Stolle e Stephan (2007) pesquisaram a resistência a antimicrobianos de linhagens isoladas de porcos em diferentes abatedouros na Suíça. Sihvonen et al. (2011) pesquisaram a resistência em linhagens isoladas de amostras fecais de humanos na Finlândia. Todos esses trabalhos relataram elevado grau de sensibilidade a antimicrobianos para linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, corroborando assim, com os resultados encontrados no presente estudo.

Uma série de estudos que utilizam metodologias para tipagem molecular, como *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA), vêm sendo utilizados com sucesso para genotipar linhagens de *Yersinia enterocolitica* (ITEMAN et al., 1996; WOJCIECH et al, 2004; FALCÃO et al., 2006; GIERCZYNSKI et al, 2007;

SOUZA et al., 2010; SIHVONEN et al., 2011; LUCERO ESTRADA et al., 2011; PAIXÃO et al., 2013; VIRTANEN et al., 2013; CAMPIONI; FALCÃO, 2013).

No presente estudo, foi feita a análise da diversidade genética das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas de humanos, animal e ambiente durante 19 anos pelas metodologias de ERIC-PCR, PFGE e MLVA.

Na tipagem molecular das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, a metodologia de ERIC-PCR diferenciou as 40 linhagens em 37 ERIC tipos distintos e apresentou 0,996 de valor de índice de discriminação, sendo o maior índice encontrado dentre as três metodologias de tipagem realizadas. Todas as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas, com exceção de duas, apresentaram alta similaridade genética, sendo esta superior a 88,3% (Figura 3), o que sugere que as linhagens pouco se diferenciaram ao longo dos 19 anos e que o meio ambiente possivelmente tem sido uma importante fonte de contaminação de humanos e animais no Brasil.

Não foi observada uma correlação epidemiológica entre os materiais analisados, o ano e local de isolamento, a presença dos marcadores relacionados à virulência, a suscetibilidade a antimicrobianos e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de ERIC-PCR (Apêndice I). Um exemplo disso é o fato da linhagem IP 7663 isoladas de fezes diarréicas no Rio de Janeiro no ano de 1979 ter ficado agrupada no mesmo grupo que a linhagem FCF 88 isolada de água em São Paulo no ano de 1982, apresentando essas linhagens similaridade de 97,9% (Figura 3).

Pelo nosso conhecimento, não existem trabalhos que utilizaram a metodologia de ERIC-PCR para tipar especificamente linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2. Há trabalhos que usaram essa metodologia na tipagem de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A (SACHDEVA; VIRDI, 2004; CAMPIONI; FALCÃO, 2013) e *Yersinia enterocolitica* biotipo 4 (FALCÃO et al., 2006; PAIXÃO et al., 2013). Um trabalho de Wojciech e colaboradores (2004) utilizou a metodologia de ERIC-PCR para tipar linhagens de *Yersinia enterocolitica*, porém nesse trabalho, os autores não especificam o biotipo das linhagens e sim o sorogrupo. Assim nesse trabalho de Wojciech et al. (2004) foram tipadas por ERIC-PCR 35 linhagens pertencentes aos sorogrupos O:3, O:5, O:6, O:7,8, O:7,9, O:8, O:9, O:13,7 e O:30.

O dendrograma de similaridade genética gerado a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE para as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas diferenciou as linhagens em 25 PFGE tipos distintos e gerou um índice de discriminação igual a 0,965. As 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas apresentaram um grau

de similaridade genética superior a 70,0% (Figura 6). A maioria das linhagens (72,5%) ficou agrupada nos grupos I e J (Figura 6) que apresentaram similaridade genética superior a 78,3%.

Não houve uma correlação epidemiológica entre os materiais analisados, o ano e local de isolamento, a presença dos marcadores relacionados à virulência, a suscetibilidade a antimicrobianos e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de PFGE (Apêndice II). Por exemplo, a linhagem FCF 602 isolada de fezes de capivara em Botucatu no ano de 1998 foi indistinguível das linhagens FCF 94, FCF 104 e FCF 105 isoladas de água em São Paulo no ano de 1982 (Figura 6).

Najdenski, Iteman e Carniel (1994) tiparam pela técnica de PFGE 20 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2. No referido trabalho, as 20 linhagens foram diferenciadas em 12 PFGE tipos e não houve uma correlação entre o local geográfico de isolamento das linhagens, visto que, linhagens de países diferentes foram agrupadas no mesmo PFGE tipo.

Um estudo realizado por Lucero Estrada e colaboradores (2011) utilizou a técnica de PFGE com sucesso para tipar linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2. Foram utilizadas por esses autores, nove linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas de alimentos entre os anos de 2004 e 2008 na cidade de San Luis, Argentina. Essas linhagens foram diferenciadas em cinco PFGE tipos distintos com índice de discriminação de 0,862 e similaridade genética superior a 60,0%.

Ambos os trabalhos acima citados realizados por Najdenski, Iteman e Carniel (1994) e por Lucero Estrada et al. (2011) corroboram com os resultados do presente estudo, mostrando que a técnica de PFGE apresenta elevado índice de discriminação. Entretanto, as linhagens do nosso estudo isoladas no Brasil, são mais similares quando comparadas às linhagens da Argentina, do estudo de Lucero Estrada e colaboradores (2011), uma vez que, as linhagens do presente estudo são de fontes e locais diferentes, além de abranger um período de isolamento muito maior.

Os resultados obtidos pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE para as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 demonstraram a alta similaridade genética entre essas linhagens, o que sugere que as mesmas pouco se diferenciaram ao longo dos 19 anos, e que, possivelmente, o meio ambiente tem sido uma importante fonte de contaminação de humanos e animais no país.

A técnica de MLVA foi proposta por Gierczynski e colaboradores em 2007. Nesse trabalho, 91 linhagens de *Yersinia enterocolitica* foram diferenciadas em 76 MLVA tipos.

Sihvonen e colaboradores (2011) estudaram 82 linhagens de *Yersinia enterocolitica* pertencentes aos bio-sorogrupos 2/O:9 (n=5), 3/O:3 (n=2) e 4/O:3 (n=75), isoladas em 2006 na Finlândia e obtiveram 77 MLVA tipos e 0,999 de índice de discriminação. Essas mesmas linhagens foram tipadas por PFGE e apresentaram 23 PFGE tipos distintos e índice de discriminação de 0,862, mostrando o alto índice de discriminação da metodologia de MLVA.

Em estudo de Virtanen e colaboradores (2013), foram tipadas 379 linhagens de *Yersinia enterocolitica* pertencentes aos sorogrupos O:5,27 (n=7), O:9 (n=9) e O:3 (n=363), isoladas na Finlândia, Alemanha, Inglaterra e Rússia. A metodologia de MLVA distinguiu as 379 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas em 312 MLVA tipos, apresentando um índice de discriminação de 0,999.

Pelo nosso conhecimento, não existem trabalhos que utilizam essa metodologia para genotipar somente linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, porém, estudos de tipagem molecular de linhagens de *Yersinia enterocolitica* que utilizam o MLVA como ferramenta, demonstraram que essa metodologia apresenta alto valor de índice de discriminação, principalmente quando comparada com outra metodologia de tipagem. Entretanto, em nosso estudo, a metodologia de MLVA apresentou o menor índice de discriminação dentre as metodologias de tipagem molecular realizadas, sendo de 0,655. Essa metodologia conseguiu diferir as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas em 7 MLVA tipos distintos. Esses resultados, portanto, diferem dos trabalhos de MLVA da literatura anteriormente citados.

O VNTR V7 não foi amplificado na maioria das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas, e, portanto este VNTR foi retirado da análise. Virtanen e colaboradores (2013) também relataram que nem todas as linhagens analisadas em seu estudo amplificaram o VNTR V7.

O dendrograma de similaridade genética gerado pela metodologia de MLVA realizada para a tipagem das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 do presente estudo, agrupou as linhagens de acordo com a sua origem (Figura 8). As linhagens de origem humana ficaram agrupadas no grupo denominado O, que continha as cinco linhagens dessa origem utilizadas no estudo, com 60,0% de similaridade entre si. As linhagens de origem ambiental foram agrupadas em um grupo denominado de P e que continha 32 linhagens, com similaridade genética superior a 60,0% entre si. A similaridade genética entre as linhagens dos grupos O e P foi maior que 37,7%. Três linhagens não se agruparam a esses dois grupos, FCF 96 e FCF 104, isoladas do ambiente e a FCF 602 isolada de animal (Figura 8).

Não houve uma correlação epidemiológica entre o ano e local de isolamento, a presença dos marcadores relacionados à virulência, a suscetibilidade a antimicrobianos e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de MLVA (Apêndice III).

O índice de discriminação de Simpson (D) indica que quanto mais eficiente foi a diferenciação entre as linhagens, mais próximo de 1,0 é esse valor. Na análise da diversidade genética das 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, o índice de discriminação de Simpson para a técnica de ERIC-PCR foi de 0,996, para PFGE foi de 0,965 e para MLVA foi de 0,655. Sendo assim, dentre as três técnicas de tipagem molecular realizadas no presente estudo, a técnica de ERIC-PCR foi a mais eficiente em discriminar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2.

A espécie *Yersinia enterocolitica* é bastante heterogênea, e é dividida em seis biotipos de acordo com a resposta frente a diferentes testes fenotípicos. Os biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 compreendem linhagens que são consideradas patogênicas para humanos e animais, enquanto o biotipo 1A consiste de linhagens consideradas não patogênicas (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

Dessa forma, na tentativa de comparar as 40 linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 com os outros biotipos pertencentes a essa espécie, nas técnicas de tipagem molecular ERIC-PCR, PFGE e MLVA foram acrescentadas 26 linhagens pertencentes aos outros biotipos de *Yersinia enterocolitica*, sendo 15 linhagens pertencentes ao biotipo 1A, duas linhagens pertencentes ao biotipo 1B, quatro linhagens pertencentes ao biotipo 3, quatro linhagens pertencentes ao biotipo 4 e uma linhagem pertencente ao biotipo 5, totalizando assim 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica*.

Um dado interessante foi a divisão dos grupos no dendrograma de ERIC-PCR para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* estudadas. Nesse dendrograma, no grupo denominado de F ficaram agrupadas todas as linhagens pertencentes ao biotipo 1A e consideradas não patogênicas. Já o grupo G agrupou todas as linhagens consideradas de baixa patogenicidade, pertencentes aos biotipos 2, 3, 4 e 5. E finalmente no grupo H ficaram agrupadas as linhagens de alta patogenicidade pertencentes ao biotipo 1B. Dessa forma, podemos dizer que a metodologia de ERIC-PCR conseguiu agrupar os diferentes biotipos de *Yersinia enterocolitica* quanto à sua patogenicidade (Figura 4).

Essa divisão quanto aos biotipos e sua patogenicidade que ocorreu na metodologia de ERIC-PCR para as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica* não foi observada nas outras

metodologias de tipagem molecular, visto que, linhagens que se diferem quanto à patogenicidade ficaram agrupadas no mesmo grupo. Na metodologia de PFGE, o grupo M agrupou linhagens pertencentes aos biotipos 1A e 1B e o grupo N agrupou linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 (Figura 7). Na metodologia de MLVA, o grupo S agrupou linhagens pertencentes aos biotipos 1A, 1B, 2 e 5 (Figura 9).

Na comparação das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 com as linhagens pertencentes aos outros biotipos, o índice de discriminação de Simpson para a técnica de ERIC-PCR foi de 0,998, para PFGE foi de 0,981 e para MLVA foi de 0,82. Dessa forma, dentre as três técnicas de tipagem molecular realizadas no presente estudo com as 66 linhagens de *Yersinia enterocolitica*, a técnica de ERIC-PCR foi a mais eficiente em discriminar as linhagens.

O trabalho de desenvolvimento da técnica de MLVA para *Yersinia enterocolitica* foi proposto para linhagens de *Yersinia enterocolitica* bio-sorogrupo 4/O:3 (GIERCZYNSKI et al., 2007), e, em nosso estudo, obtivemos sucesso na amplificação de cinco dos seis VNTRs propostos no trabalho de Gierczynski e colaboradores (2007) para tipagem de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, bem como das linhagens pertencentes aos outros biotipos. Porém oito linhagens pertencentes ao biotipo 1A não amplificaram nenhum dos seis VNTRs e, portanto, essas linhagens foram retiradas da análise. Isso pode ser explicado pela grande diversidade do biotipo 1A dentre os outros biotipos da espécie. Um trabalho proposto por Gulati, Varshney e Viridi (2009) traz a genotipagem de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A, com a utilização de *primers* para a pesquisa de regiões VNTRs diferentes das pesquisadas no nosso estudo. Porém, isso não exclui o fato de que linhagens do biotipo 1A possam amplificar as regiões VNTRs propostas por Gierczynski e colaboradores (2007), visto que no nosso estudo, sete (46,7%) linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A amplificaram dois ou mais VNTRs.

O potencial patogênico das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 foi evidenciado pela prevalência da maioria dos marcadores de virulência pesquisados, bem como, pelo comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos. Algumas linhagens apresentaram-se resistentes a antimicrobianos de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *Y. enterocolitica*, o que pode acarretar em falha terapêutica. Os dados obtidos pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE para a análise da diversidade genética demonstraram a grande similaridade entre as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 estudadas, sugerindo que as linhagens pouco se diferenciaram ao longo dos 19 anos e que o

meio ambiente possa ser uma fonte de contaminação para humanos e animais no Brasil. A técnica de MLVA foi eficiente em separar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 quanto à sua origem e a técnica de ERIC-PCR conseguiu separar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 quanto às diferentes patogenicidades características de cada biotipo. Finalmente, dentre as metodologias utilizadas para tipagem molecular, a metodologia de ERIC-PCR foi a que apresentou maior poder discriminatório.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram ampliar os conhecimentos sobre o potencial patogênico, a suscetibilidade frente a antimicrobianos, a epidemiologia e a diversidade genética de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 isoladas no Brasil.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A resistência a sulfametoxazol - trimetoprima, amicacina e gentamicina, encontrada em algumas linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2, sugere a possibilidade de falha terapêutica, uma vez que esses antimicrobianos são os de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *Yersinia enterocolitica*;
- O potencial patogênico das linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 foi evidenciado devido à presença da maioria dos marcadores de virulência pesquisados, bem como, devido ao comportamento relacionado à virulência frente aos testes fenotípicos de atividade da pirazinamidase, hidrólise da esculina e fermentação da salicina;
- Sucessivos repiques das linhagens com consequente perda do plasmídeo pYV podem explicar a baixa detecção do gene plasmidial *virF* e a alta negatividade frente aos testes de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C e absorção do vermelho congo;
- Os resultados de ERIC-PCR e PFGE para as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 demonstraram uma alta similaridade genética entre a maioria dessas linhagens, sugerindo que as mesmas pouco se diferenciaram ao longo de 19 anos e que o meio ambiente possivelmente tem sido uma importante fonte de contaminação de humanos e animais no Brasil;
- A metodologia de MLVA agrupou as linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2 conforme a origem;
- A metodologia de ERIC-PCR conseguiu agrupar as linhagens de *Yersinia enterocolitica* dos biotipos 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 em grupos de alta patogenicidade, baixa patogenicidade e não patogênicos, de acordo com as patogenicidades características de cada biotipo, entretanto as metodologias de PFGE e MLVA não forneceram qualquer informação epidemiológica;
- A metodologia de ERIC-PCR foi a mais eficiente em diferenciar as linhagens em comparação a PFGE e MLVA, de acordo com o índice de discriminação (*D*).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAGAT, N.; VIRDI, J.S. Distribution of virulence associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiology Letters**, n. 266, p. 177-183, 2007.

BHADURI, S.; SMITH, J.L. Virulence Plasmid (pYV) associated expression of phenotypic virulent determinants in pathogenic *Yersinia* species: a convenient method for monitoring the presence of pYV under culture conditions and its application for isolation/detection of *Yersinia pestis* in food. **Journal of Pathogens**, v. 2, p. 01-09, 2011.

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

BONARDI, S.; PARIS, A.; BASSI, L.; SALMI, F.; BACCI, C.; RIBOLDI, E.; BONI, E.; D'INCAU, M.; TAGLIABUE, S.; BRINDANI, F. Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 10, p. 1785-1792, 2010.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 257-276, 1997.

CAMPIONI, F.; DAVIS, M.; MEDEIROS, M.I.C.; FALCÃO, J.P.; SHAH, D. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 174-181, 2013.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J.P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, 2013. doi: 10.1111/apm.12126.

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

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-patogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes and Infection**, n. 3, p. 561-569, 2001.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI, documento M100-S22. Wayne, PA, USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

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

DE GREGÓRIO, E.; SILVESTRO, G.; PETRILLO, M.; CARLOMAGNO, M.S.; DI NOCERA, P.P. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in *Yersinia*: genomic organization and functional properties. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 7945-7954, 2005.

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 Disease**, v. 9, n. 3, p. 179-189, 2012.

EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, p. 01-250, 2013.

FÁBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 1, p. 24-32, 2012.

FALCÃO, J.P.; BROCCHI, M.; PROENÇA-MÓDENA, J.L.; ACRANI, G.O.; CORRÊA, E.F.; FALCÃO, D.P. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica*

and *Yersiniae* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **Journal of Applied Microbiology**, n. 96, p. 1230-1236, 2004.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 09-19, 2006.

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

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

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

FARMER III, J.J.; CARTER, G.P.; MILLER, V.L.; FALKOW, S.; WACHSMUTH, I.K. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and d-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2589-2594, 1992.

FAVIER, G.I.; ESCUDERO, M.E.; GUZMÁN, A.M.S. Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from the surface of chicken eggshells obtained in Argentina. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1812-1815, 2005.

FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNING, S.D.; MARRS, C. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, n. 2, p. 01-08, 2005.

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

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 207-212, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; CERNELA, N.; HACLER, H.; STHEPHAN, R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001 - 2010. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1543-1550, 2012.

GIERCZYNSKI, R.; GOLUBOV, A.; NEUBAUER, H.; PHAM, J.N. ; RAKIN, A. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* and its application to bioserogroup 4/O3 subtyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2508-2515, 2007.

GOERING, R.V. Pulsed Field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infectious, Genetics and Evolution**, n. 10, p. 866-875, 2010.

GUIYOULE, A.; RASOAMANNA, B.; BUCHRIESER, C.; MICHAEL, P.; CHANTEAU, S.; CARNIEL, E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2826-2833, 1997.

GULATI, P.; VARSHNEY, R.K.; VIRDI, J.S. Multilocus variable number tandem repeat analysis as a tool to discern genetic relationships among strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. **Journal of Applied Microbiology**, n. 107, p. 875-884, 2009.

HEUSIPP, G.; YOUNG, G.M.; MILLER, V.L. HreP, an vivo-expressed protease of *Yersinia enterocolitica*, is a new member of the family of subtilisin/kexin-like proteases. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3556-3563, 2001.

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

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, n. 4, p. 844-849, 2011.

IBRAHIM, A.; LIESACK, W.; GRIFFITHS, M.W.; ROBINS-BROWNE, R.M. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1636-1638, 1997.

ITEMAN, L.; GUIYOLE, 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.

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

KEIM, P.; PRICE, L.B.; KLEVYTSKA, A.M.; SMITH, K.L.; SCHUPP, J.M.; OKINAKA, R.; JACKSON, P.J.; HUGH-JONES, M.E. Multiple locus variable number tandem repeats analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **The Journal of Bacteriology**, n. 182, p. 2928-2936, 2000.

KOT, B.; TRAFNY, E.A. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, n. 7, p. 27-31, 2004.

LEO, J.C.; SKURNIK, M. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 715, p. 01-15, 2011.

LINDSTEDT, B.A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, n. 26, p. 2567-2582, 2005.

LOBATO, M.J.; LANDERAS, E.; GONZALES-HEVIA, M.A.; MENDONZA, M.C. Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes and biotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3297-3301, 1998.

LUCERO ESTRADA, C.S.M.; VELÁZQUEZ, L.D.C.; ESCUDERO, M.E.; FAVIER, G.I.; LAZARTE, V.; GUZMÁN, A.M.S. Pulsed field, PCR ribotyping and multiplex PCR analysis of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from meat food in San Luis Argentina. **Food Microbiology**, n. 28, p. 21-28, 2011.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequence in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525-4529, 1992.

MACDONALD, E.; HEIER, B.T.; NYGARD, K.; STALHEIM, T.; CUDJOE, K.S.; SKJERDAL, T.; WESTER, A.L.; LINDSTEDT, B.A.; STAVNES, T.L.; VOLD, L. *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with ready-to-eat salad mix, Norway, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1496-1499, 2012.

MURROS-KONTIAINEN, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; JOHANSSON, P.; RAHKILA, R.; BJORKROTH, 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.; BJORKROTH, J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2363-2377, 2011b.

NAJDENSKI, H.; ITEMAN, I.; CARNIEL, E. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 2913-2920, 1994.

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

NEUBAUER, H.; HENSEL, A.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 58-62, 2000a.

NEUBAUER, H.; ALEKSIC, S.; HENSEL, A.; FINKE, E.J.; MEYER, H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but from three homology groups. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 61-64, 2000b.

NICOLLE, P.; MOLLARET, H.H.; BRAULT, J. New results on the phage typing of *Yersinia enterocolitica*, concerning more of 4000 strains of various origins (author's transl). **Revue D'épidémiologie et de Santé Publique**, v. 24, n. 6, p. 479-496, 1976.

NOCKER, A.; FALCÃO, D.P.; FALCÃO, J.P. **Yersinia**, disponível em: http://www.waterbornepathogens.org/index.php?option=com_content&view=article&id=63&Itemid=69, Acesso em: 12 de junho de 2013.

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

ORTIZ MARTÍNEZ, P.; MYLONA, S.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; CORRY, J.E.L. Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 64-69, 2010.

PAIXÃO, R.; MORENO, L.Z.; GOBBI, D.D.S.; RAIMUNDO, D.C.; FERREIRA, T.S.P.; SPINDOLA, M.G.; HOFER, H.; REIS, C.M.F.; MATTÉ, M.H.; MORENO, A.M. Genotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 4/O:3 isolates from pigs and

slaughterhouses using SE-AFLP, ERIC-PCR, and PFGE. **Journal of Pathogens**, v. 13, p. 01-08, 2013.

PHAM, J.N.; BELL, S.M.; MARTIN, L.; CARNIEL, E. The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 951-957, 2000.

POURCEL, C.; ANDRE-MAZEAUD, F.; NEUBAUER, H.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 01-09, 2004.

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

RILEY, G.; TOMA, S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 213-214, 1989.

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

SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 4, p. 01-15, 2013.

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

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

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**. ASM Press, Washington, D.C., p. 627-638, 2011.

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

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

SIHVONEN, L.M.; TOIVONEN, S.; HAUKKA, K.; KUUSI, M.; SKURNIK, M.; SIITONEN, A. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 42, p. 01-10, 2011.

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

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 identifying species among *Yersinia* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 141-150, 2010.

SOUZA, R.A.; FALCÃO, D.P.; FALCÃO, J.P. Emended description of *Yersinia massiliensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1094-1097, 2011.

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

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

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 07-20, 1997.

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

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, p. 309-315, 1982a.

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

VAN BELKUM, A.; STRUELENS, M.; DE VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 547-560, 2001.

VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 22-27, 2007.

VERGNAUND, G.; POURCEL, C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. In: Molecular Epidemiology of Microorganisms. **Methods in Molecular Biology**, v. 551, cap. 12, p. 141-158, 2009.

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

VIRTANEN, S.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; ORTIZ MARTÍNEZ, P.; SIITONEN, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis in genotyping *Yersinia enterocolitica* strains from human and porcine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2154-2159, 2013.

WAUTERS, G.; ALEKSIC, 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.

WILSON, L.; SHARP, P.M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implication for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-1168, 2006.

WOJCIECH, L.; STARONIEWICZ, Z.; JAKUBCZAK, A.; UGORSKI, M. Typing of *Yersinia enterocolitica* isolates by ITS profiling, REP and ERIC-PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 238-244, 2004.

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

ZHENG, H.; SUN, Y.; MAO, Z.; JIANG, B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, p. 368-374, 2008.

APÊNDICES

Apêndice I - Correlação entre o material, ano e local de isolamento, a suscetibilidade a antimicrobianos, a presença dos marcadores relacionados à virulência e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de ERIC-PCR

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	ERIC Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos								Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	fepD	fes	virF	ystB	fepA	
FCF 103	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 99	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 106	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 102	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 111	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 116	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 112	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 117	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 89	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 97	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 110	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 113	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 98	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 114	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 88	Água	1982	São Paulo	A	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
IP 7663	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 91	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 86	Água	1982	São Paulo	A	Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 87	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 95	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 107	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
IP 7664	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 100	Água	1982	São Paulo	A	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
FCF 108	Água	1982	São Paulo	A	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

Continua

Conclusão

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	ERIC Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos							Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	sepD	fes	virF	ystB	sepA
FCF 96	Água	1982	São Paulo	A	Cfo, Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IP 7665	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	A	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
FCF 104	Água	1982	São Paulo	B	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 105	Água	1982	São Paulo	B	Ami, Cfo	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 127	Água de esgoto	1982	São Paulo	B	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 142	Água de esgoto	1982	São Paulo	B	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 90	Água	1982	São Paulo	B	Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 101	Água	1982	São Paulo	C	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 115	Água	1982	São Paulo	C	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 109	Água	1982	São Paulo	C	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 92	Água	1982	São Paulo	D	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 93	Água	1982	São Paulo	D	Ami	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 602	Fezes de capivara	1998	Botucatu	D	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
FCF 94	Água	1982	São Paulo	D	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IP 7661	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	E	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IP 7662	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	E	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Sut: sulfametaxazol-trimetoprima, Ami: amicacina, Gen: gentamicina, Cfo: cefoxitina, S: Fermentação da salicina, E: hidrólise da esculina, P: atividade da enzima pirazinamidase, AA: autoaglutinação a 37°C, CA: dependência ao cálcio a 37°C, VC: absorção do vermelho congo. -: negativo, +: positivo, Sens.: Sensível a todos os 14 antimicrobianos testados.

Apêndice II - Correlação entre o material, ano e local de isolamento, a suscetibilidade a antimicrobianos, a presença dos marcadores relacionados à virulência e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de PFGE

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	PFGE Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos								Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	fepD	fes	virF	ystB	fepA	
FCF 86	Água	1982	São Paulo	I	Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 95	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 92	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 91	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 88	Água	1982	São Paulo	I	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 101	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 102	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 98	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 99	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 89	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 96	Água	1982	São Paulo	I	Cfo, Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 104	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 105	Água	1982	São Paulo	I	Ami, Cfo	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 602	Fezes de capivara	1998	Botucatu	I	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-		
FCF 94	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 87	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 106	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 107	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 108	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 93	Água	1982	São Paulo	I	Ami	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
FCF 97	Água	1982	São Paulo	I	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
IP 7661	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	J	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
IP 7662	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	J	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
IP 7663	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	J	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		

Continua

Conclusão

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	PFGE Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos							Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	fepD	fes	virF	ystB	fepA
IP 7664	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	J	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IP 7665	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	J	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
FCF 90	Água	1982	São Paulo	J	Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 127	Água de esgoto	1982	São Paulo	J	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 142	Água de esgoto	1982	São Paulo	J	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 103	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 113	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 109	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 111	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 110	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 114	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 100	Água	1982	São Paulo	K	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 115	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 116	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 117	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 112	Água	1982	São Paulo	K	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Sut: sulfametaxazol-trimetoprima, Ami: amicacina, Gen: gentamicina, Cfo: cefoxitina, S: fermentação da salicina, E: hidrólise da esculina, P: atividade da enzima pirazinamidase, AA: autoaglutinação a 37°C, CA: dependência ao cálcio a 37°C, VC: absorção do vermelho congo. -: negativo, +: positivo, Sens.: Sensível a todos os 14 antimicrobianos testados.

Apêndice III - Correlação entre o material, ano e local de isolamento, a suscetibilidade a antimicrobianos, a presença dos marcadores relacionados à virulência e os grupos obtidos no dendrograma gerado a partir da análise dos dados obtidos pela metodologia de MLVA

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	MLVA Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos							Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	fepD	fes	virF	ystB	fepA
IP 7662	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	O	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IP 7664	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	O	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IP 7665	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	O	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IP 7661	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	O	Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IP 7663	Fezes humanas	1979	Rio de Janeiro	O	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 96	Água	1982	São Paulo		Cfo, Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 101	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 102	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 103	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 106	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 112	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 114	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 127	Água de esgoto	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 86	Água	1982	São Paulo	P	Sut	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 88	Água	1982	São Paulo	P	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 91	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 95	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 100	Água	1982	São Paulo	P	Ami, Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 105	Água	1982	São Paulo	P	Ami, Cfo	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 107	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 108	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 109	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 110	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 111	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Continua

Conclusão

Linhagens	Material	Ano de isolamento	Local de isolamento	MLVA Grupo	Perfil de resistência	Testes fenotípicos							Marcadores de virulência									
						S	E	P	AA	CA	VC	inv	ail	ystA	hreP	tccC	myfA	fepD	fes	virF	ystB	fepA
FCF 113	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 115	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 116	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 117	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 142	Água de esgoto	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 87	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 89	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 90	Água	1982	São Paulo	P	Gen	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 92	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 93	Água	1982	São Paulo	P	Ami	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 94	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 97	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 98	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 99	Água	1982	São Paulo	P	Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 104	Água	1982	São Paulo		Sens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FCF 602	Fezes de capivara	1998	Botucatu		Sens.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

Sut: sulfametaxazol-trimetoprima, Ami: amicacina, Gen: gentamicina, Cfo: cefoxitina, S: Fermentação da salicina, E: hidrólise da esculina, P: atividade da enzima pirazinamidase, AA: autoaglutinação a 37°C, CA: dependência ao cálcio a 37°C, VC: absorção do vermelho congo. -: negativo, +: positivo, Sens.: Sensível a todos os 14 antimicrobianos testados.

ANEXOS

Anexo I - Meio de cultura EPM

- Base A:

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

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

- Solução B:

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

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

- Preparo do meio EPM:

Base A	1000,0 mL
Solução B	17,5 mL

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

Anexo II - Meio de cultura MILi

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

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

Anexo III - Meio ágar CR-MOX para o teste de dependência ao cálcio a 37°C e absorção do corante vermelho congo**- Solução A:**

Ágar soja triptica (Difco)	40,0 g
Água destilada	825,0 mL

Após completa dissolução por aquecimento, a solução A foi autoclavada a 121°C por 20 minutos.

- Solução B:

Oxalato de sódio	0,25 M
Cloreto de magnésio	0,25 M
Vermelho congo	1,0%
D-galactose	20,0%

Para se obter essas molaridades e porcentagens, foram preparadas as seguintes soluções: oxalato de sódio em 80,0 mL de água destilada; cloreto de magnésio em 80,0 mL de água destilada; vermelho congo em 5,0 mL de água destilada e D-galactose em 10,0 mL de água destilada. Após completa dissolução, os constituintes da solução B foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, com exceção da D-galactose que foi esterilizada por filtração em membrana filtrante, com poros de 0,22 µm de diâmetro. Após o resfriamento, os volumes das soluções A e B foram misturados, preparando-se um volume final de 1000,0 mL, que foi distribuído, de forma asséptica, em placas de Petri estéreis.

Anexo IV - Meio ágar pirazinamidase

Ágar soja tríptica (Difco)	30,0 g
Extrato de levedura (Difco)	3,0 g
Ácido amino pirazínico (Sigma)	1,0 g
Tampão Tris maleato 0,2 M pH 6,0 (Merck)	1000 mL

Inicialmente a solução tampão foi preparada e o pH foi ajustado para 6,0. A seguir os constituintes do meio foram dissolvidos em 1000 mL do tampão e aquecidos até completa dissolução. O meio foi distribuído em tubos de vidro, autoclavado a 121°C por 20 minutos, e em seguida, os tubos foram inclinados em um ângulo de aproximadamente 25 graus para solidificação.

Anexo V - Meio para teste da fermentação da salicina

- Meio base para carboidrato:

Peptona (Difco)	10,0 g
Extrato de carne (BBL)	3,0 g
NaCl (Merck)	5,0 g
Indicador de Andrade	10,0 mL
Salicina (Merck)	1%
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

- Indicador de Andrade:

Fucsina ácida (Merck)	0,2 g
NaOH 1N (Synth)	16,0 mL
Água destilada	100,0 mL

O meio base para carboidrato foi inicialmente preparado dissolvendo-se todos os constituintes, com exceção do indicador de Andrade, por leve aquecimento em 900,0 mL de água destilada e acertando-se o pH da solução para 7,2. Depois de acertado o pH, foram adicionados os 10,0 mL do indicador de Andrade à solução e o volume final de 1000 mL foi completado com água destilada. A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos. Após isso, 1% de salicina já esterilizada (por filtração em membrana filtrante com poros de 0,22 µm de diâmetro) foi acrescentado ao meio e este foi distribuído em tubos de vidro.

Anexo VI - Meio para teste da hidrólise da esculina

Peptona (Difco)	5,0 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,0 g
Esculina (Merck)	5,0 g
Citrato férrico amoniacal (Merck)	0,5 g
Indicador de Andrade	10,0 mL
Água destilada	990,0 mL

O meio foi preparado dissolvendo-se todos os constituintes em 990,0 mL de água destilada por leve aquecimento, e então, foram acrescentados 10,0 mL do indicador de Andrade. Aproximadamente 2,0 mL do meio foram distribuídos em tubos de vidro e após isso, os tubos foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos.