

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Roberto Antonio de Souza

Ribeirão Preto

2013

RESUMO

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

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

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

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

1. Introdução

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

(Carl Gustave Jung)

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os membros do gênero *Yersinia* fermentam a glicose com produção de ácido, mas sem produção de gás, são catalase positiva, oxidase negativa, não são hemolíticas em ágar sangue de carneiro a 5%. A maioria das linhagens de *Yersinia* multiplica-se nos meios de cultura usados na rotina laboratorial, como ágar sangue, ágar chocolate, ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e ágar MacConkey quando incubados a 37°C em condições de aerofilia, mas podem ser suplantadas por outras bactérias em amostras de origem clínica e, principalmente, de origem ambiental. Nesses meios de cultivo, as colônias são muito pequenas, arredondas, opacas, incolores, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro após 24 horas de incubação. O uso de outros meios de isolamento de enterobactérias como ágar SS-desoxicolato, ágar Hektoen entérico, ágar eosina-azul de metileno (EMB) e ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) não fornece nenhuma vantagem para o isolamento de *Y. enterocolitica* e para a diferenciação das demais espécies de *Yersinia* dos outros micro-organismos presentes na microbiota fecal (SCHRIEFER; PETERSEN, 2011).

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

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

1.2. *Yersinia pestis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a sensível; ^b resistente

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

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

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

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

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

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

as linhagens patogênicas de *Y. enterocolitica* pertencem, principalmente, aos sorogrupos O:1,2,3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32, O:5,27; O:13a,13b; O:18; O:20 e O:21 e os bio-sorogrupos mais relacionados a doenças no homem incluem 4/O:3; 1B/O:8; 2/O:9 e 2/O:5,27 (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007). No Brasil já foi relatado o isolamento de *Y. enterocolitica* dos bio-sorogrupos 4/O:3; 1A/O:5; 2/O:5; 3/O:5,27; 1A/O:6,30 e 1A/O:8,19 a partir de fontes humanas (FALCÃO et al., 2008).

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

Y. enterocolitica também pode ser classificada quanto à sensibilidade a diferentes fagos. No esquema para fagotipagem existem nove fagotipos: II, VIII, IX_a, IX_b, XI, X, X₃, X_z e X₀ (NICOLLE; MOLLARET; BRAULD, 1976). Devido à necessidade de manutenção de estoques de fagos biologicamente ativos e de linhagens controle, a fagotipagem está disponível apenas em poucos laboratórios (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Outros fatores de virulência codificados por genes cromossomais são também importantes para a virulência de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. A produção de fímbrias que participam da aderência da bactéria ao epitélio intestinal é determinada pelo gene *myf* em *Y. enterocolitica* e pelo gene *psa* em *Y. pseudotuberculosis* (CARNIEL, 1995; IRIARTE et al., 1993). A presença da ilha de alta patogenicidade (HPI) no cromossomo *Y. enterocolitica* 1B e algumas linhagens de *Y. pseudotuberculosis* confere a bactéria a capacidade de quelar o ferro ligado a proteínas eucarióticas e utilizá-lo para sua multiplicação (CARNIEL, 1995; KOORNHOF; SMEGO; NICOL, 1999; RAKIN et al., 1999). O gene *ure* é responsável pela síntese da enzima urease, a qual hidrolisa a uréia para formar ácido carbônico e amônia, permitindo à bactéria escapar da barreira ácida estomacal e causar doença (DE KONING-WARD; ROBINS-BROWNE, 1995). A síntese do lipopolissacarídeo (LPS) em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* é codificada pelo locus *rfb* e regulada pela temperatura. Ao multiplicarem-se a 25°C, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* possuem um LPS liso e expressam a cadeia completa do antígeno O, enquanto que ao multiplicarem-se a 37°C apresentam células rugosas devido à repressão da síntese do LPS. O LPS liso estimula a virulência por aumentar a hidrofobicidade e, dessa maneira, facilitar a passagem da bactéria através do muco que forra o epitélio intestinal. Por outro lado, o LPS rugoso por apresentar cadeias alongadas somáticas (O), pode ocultar proteínas de superfície associadas à virulência tais como Ail e YadA, requeridas numa fase tardia da infecção. A repressão da síntese do LPS

a 37°C pode aumentar as chances de a bactéria sobreviver nos tecidos, permitindo-lhe expor na superfície seus determinantes de virulência no período apropriado da infecção (ROBINS-BROWNE, 2001; SKURNIK; BENGOCHEA, 2003).

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

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

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

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

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

^a marcadores plasmidiais; ^b marcadores cromossomais;

1.4. *Yersinia ruckeri*

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

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

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

1.5. *Yersinia frederiksenii*

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

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

1.6. *Yersinia kristensenii*

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

1.7. *Yersinia aldovae*

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

1.8. *Yersinia intermedia*

A espécie *Y. intermedia* foi descrita por Brenner et al. (1980) para um grupo de linhagens de *Y. enterocolitica-like* ramnose, melibiose, rafinose, α -metil-D-glicosídeo e ornitina descarboxilase positivas. Os sorogrupos O:4 e O:17 são os mais predominantes, entretanto, a maioria das linhagens de *Y. intermedia* não é sorotipável pelo esquema de Wauters et al. (1991). É uma espécie bioquimicamente heterogênea, que pode ser dividida em 10 biotipos de acordo com características fenotípicas conforme descrito na Tabela 7. Tem sido isolada principalmente de água, peixes, ostra, camarão, caramujos, animais selvagens e domésticos, alimentos e humanos, incluindo pessoas com desordens gastrintestinais (SULAKVELIDZE, 2000). No Brasil, os bio-sorogrupos mais comuns são o 1/O:13,7; 1/O:18 e 4/O:40 (FALCÃO et al., 2008).

Tabela 7. Testes bioquímicos utilizados para a biotipagem de *Y. intermedia* após incubação a 25°C por 48 horas (MARTIN et al., 2009)

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

^a +, $\geq 90\%$ de amostras positivas; -, $\geq 90\%$ de amostras negativas; V, variável

1.9. *Yersinia rohdei*

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

1.10. *Yersinia mollaretii*

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

1.11. *Yersinia bercovieri*

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

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

1.12. *Yersinia aleksiciae*

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

1.13. *Yersinia massiliensis*

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

1.14. *Yersinia similis*

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

1.15. *Yersinia entomophaga*

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

1.16. *Yersinia pekkanenii*

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

1.17. *Yersinia nurmii*

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

1.18. Tipagem molecular de *Yersinia* spp.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

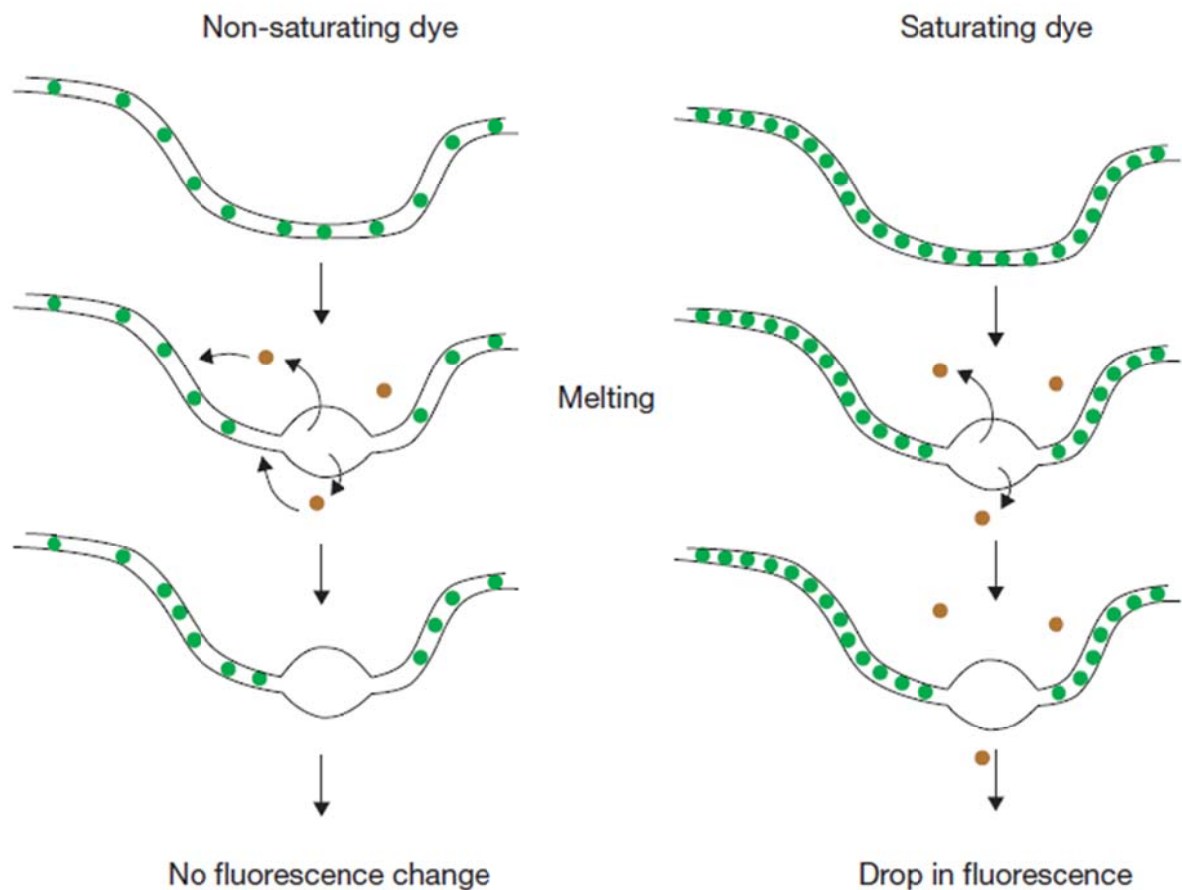


Figura 1. Agentes intercalantes de DNA saturantes e não saturantes (KAPABIOSYSTEMS, 2012).

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

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

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

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

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

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

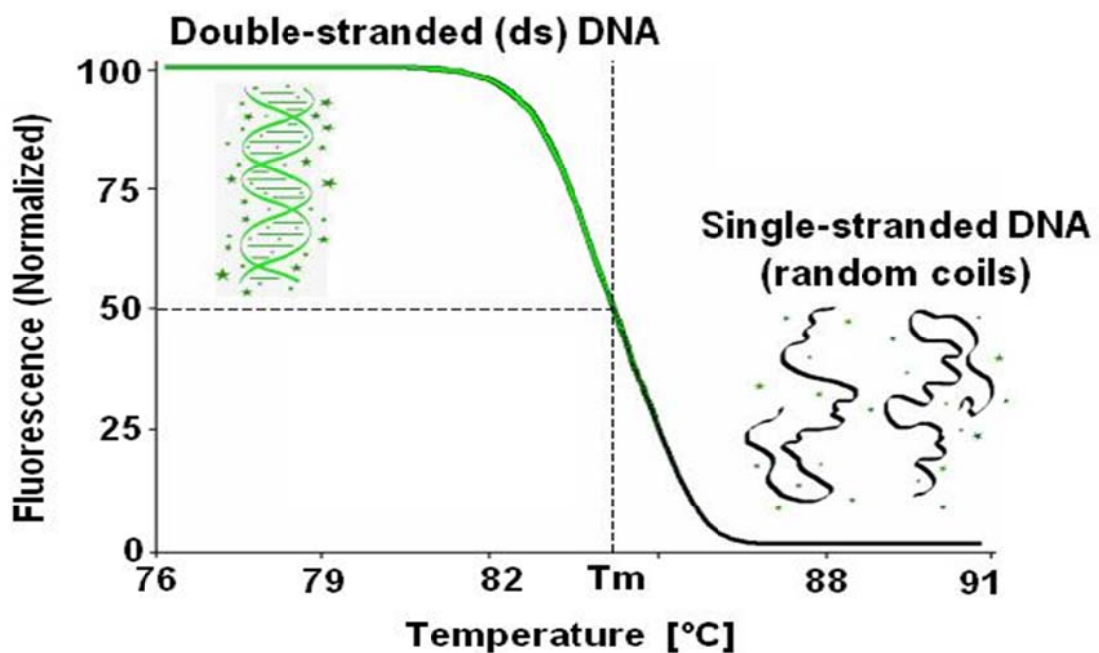


Figura 2. Dados de fluorescência mostrando uma redução linear da fluorescência a baixas temperaturas seguida por uma rápida redução ao redor da temperatura de *melting* característica do *amplicon* (REED; KENT; WITTWER, 2007).

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

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

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

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

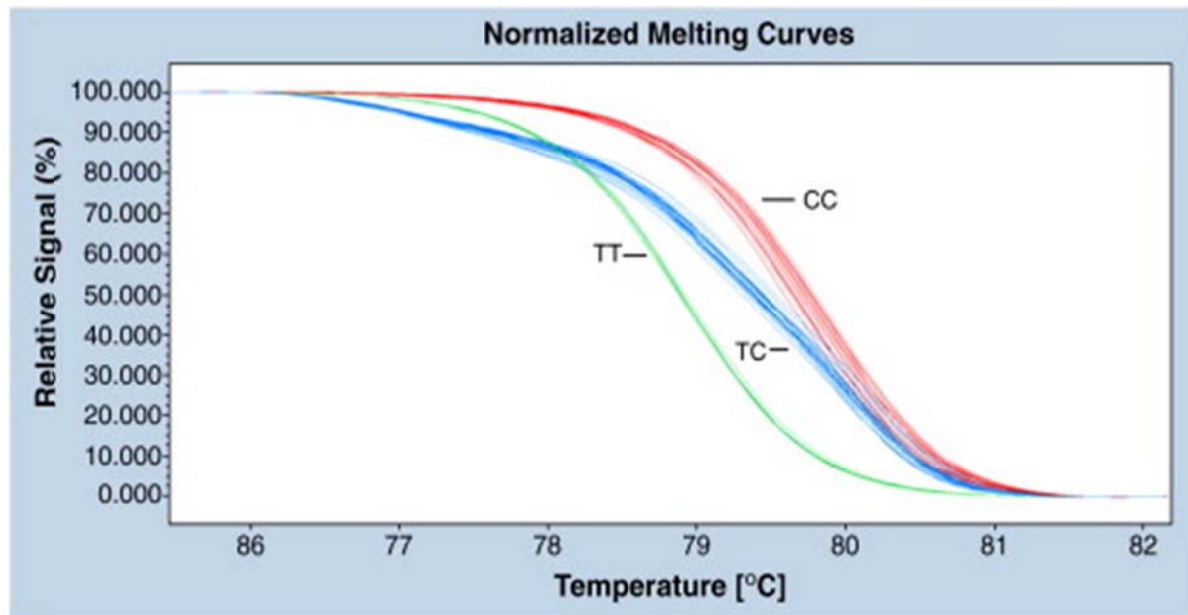


Figura 3. Análise de *melting* de um DNA heterozigoto (ZENG et al., 2012).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Conclusões

“Não há fatos eternos,
como não há verdades absolutas”

(Friedrich Nietzsche)

7. CONCLUSÕES

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

8. Referências bibliográficas¹

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NICOLLE, P., MOLLARET, H.H., BRAULT, J. New results on the phage typing of *Yersinia enterocolitica*, concerning more of 4,000 strains of various origins. **Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique**, v. 24, p. 479-496, 1976.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

URSING, J., BRENNER, D.J., BERCOVIER, H., FANNING, G.R., STEIGERWALT, A.G., BRAULT, J., H.H., M. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica* like). **Current Microbiology**, v. 4, p. 213-217, 1980.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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