

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Miliane Rodrigues Frazão

Ribeirão Preto

2013

RESUMO

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Yersinia*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. *Yersinia enterocolitica*

1.2.1. Características da espécie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.2. Marcadores relacionados à virulência

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3. Manifestações clínicas e patogênese

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

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

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

1.2.4. Tratamento e suscetibilidade a antimicrobianos

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

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

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

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

lactamases (A e B). Essas duas lactamases conferem resistência à ampicilina, cefalotina, carbenicilina e ticarcilina. Enquanto o bio-sorogrupo 4/O:3 de *Y. enterocolitica*, geralmente, produz ambas enzimas A e B, a maioria das linhagens dos biotipos 2 e 3 não produzem a lactamase A, o que pode explicar a sensibilidade desses biotipos à carbenicilina e à ticarcilina (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

1.3. Evolução dos métodos de tipagem bacteriana

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

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

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

1.3.1. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2. *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* biotipo 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DRUMMOND, N.; MURPHY, B.P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M.B.; BUCKLEY, J.F.; FANNING, S. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 179-189, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HURST, M.R.; BECHER, S.A.; YOUNG, S.D.; NELSON, T.L.; GLARE, T.R. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 844-849, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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