

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
CEPAS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLADAS DE
DIFERENTES ORIGENS NO BRASIL**

LEONARDO ALVES RUSAK

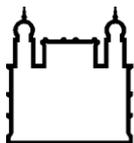
Rio de Janeiro

2013

DISSERT. MMT - IOC

L.A. RUSAK

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LEONARDO ALVES RUSAK

Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diferentes origens no Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dra. Marise Dutra Asensi
Prof. Dra. Deyse Christina Vallim da Silva

RIO DE JANEIRO

Maio de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

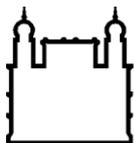
R949 Rusak, Leonardo Alves

Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diferentes origens no Brasil / Leonardo Alves Rusak. – Rio de Janeiro, 2013.
xvii,87 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Bibliografia: f. 59-70

1. *Yersinia enterocolitica*. 2. Genes. 3. Virulência. 4. Antibiograma. 5. PCR. 6. ERIC. 7. PFGE. I. Título.

CDD 579.34



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: LEONARDO ALVES RUSAK

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA ISOLADAS DE DIFERENTES ORIGENS NO BRASIL**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Marise Dutra Asensi
Prof. Dra. Deyse Christina Vallim da Silva

Aprovada em: 28 / 05 / 2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ernesto Hofer (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)- **Presidente**
Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- FIOCRUZ)
Prof. Dra. Elba Regina Sampaio Lemos (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)
Prof. Dr. Felipe Anibal Carvalho Costa (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)
Prof. Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 28 de Maio de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que me foram concedidas.

Aos meus pais, Renato e Joana, por terem tido condições de me proporcionar um bom estudo, além de ensinarem valores indispensáveis à minha vida.

Ao meu irmão, Adriano que, mesmo morando longe, sempre demonstrou preocupação comigo.

À minha esposa, Andressa, pela assessoria linguística e gráfica e por ter sido uma grande incentivadora da minha carreira desde o início.

Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas - Listeria - em especial o Dr. Ernesto Hofer, por todo o conhecimento que me foi transmitido e atenção que me foi dispensada e por ter me cedido as amostras para a realização deste estudo.

À Dra. Marise Dutra Asensi por me orientar neste trabalho, me auxiliando a resolver os problemas que foram surgindo.

À Dra. Deyse Christina Vallim da Silva pela co-orientação deste trabalho e pela amizade.

Aos técnicos Christiane Falavina dos Reis e André Victor Barbosa, pelo auxílio técnico na identificação das amostras, e André Felipe Mercês Santos pelo auxílio na técnica do PFGE.

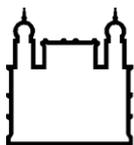
A todos os meus amigos e colegas da Medicina Tropical que enfrentaram comigo as várias horas de aula e o trabalho de campo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio financeiro.

**"Penso 99% vezes e nada descubro.
Deixo de pensar, mergulho no silêncio,
e a verdade me é revelada."**

(Albert Einstein)

**"O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da
vida." (Cora Coralina)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

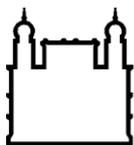
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLADAS DE DIFERENTES ORIGENS NO BRASIL RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Leonardo Alves Rusak

Desde a sua inclusão na família *Enterobacteriaceae*, em 1972, *Yersinia enterocolitica* vem sendo extensivamente estudada, por se tratar de um patógeno de natureza zoonótica com relevância em saúde pública, amplamente distribuído na natureza em reservatórios aquáticos e fontes animais. Tendo o suíno como principal reservatório, por ser portador de cepas dos mesmos biosorotipos encontrados em humanos, *Y. enterocolitica* possui diversos genes de patogenicidade, tanto cromossomiais (*inv*, *ail* e *ystA*) como plasmidiais (*virF*), que lhes confere a capacidade de invadir e sobreviver em um organismo hospedeiro. Esse estudo teve como objetivo analisar cepas de *Y. enterocolitica* oriundas de fontes animal, alimentar, ambiental e humana de diferentes regiões do Brasil, para a detecção dos genes de virulência supracitados através da técnica da PCR em conjunto com testes fenotípicos, além da análise da susceptibilidade aos antimicrobianos através do método de disco-difusão para que, junto com os resultados da PCR, pudesse ser avaliado seu potencial patogênico. Para a avaliação da diversidade filogenética das cepas foram empregadas as técnicas de ERIC-PCR e do PFGE. Em um total de 60 amostras, foram encontradas 11(18%) amostras pertencentes ao sorotipo O:3, biotipo 4 de origens humana e animal possuidoras de todos os genes de virulência. Dez amostras humanas (O:3/B4) apresentaram somente os 3 genes cromossomiais, e 9 amostras pertencentes ao biotipo 1A apresentaram o gene *inv*. No que tange à resistência aos antimicrobianos, 60 (100%) amostras foram resistentes à ampicilina, 58(97%) à cefalotina, 6(10%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, 7(12%) à tetraciclina e 1(2%) à amicacina. O perfil de resistência predominante foi AMP-KF-RL. Cinco amostras apresentaram resistência a cinco antibióticos, sendo a amostra YE42 resistente a 3 classes de antibióticos diferentes. O ERIC-PCR revelou a existência de 32 ERIC genótipos (EGT), gerando um índice discriminatório de diversidade de 0,924. Quarenta amostras pertencentes ao sorovar O:3 biotipo 4 de origens humana, animal, alimentar e ambiental ficaram agrupadas dentro de 12 EGTs em um conjunto com uma similaridade de 85%. Já as amostras do Biotipo 1A isoladas de alimentos e ambiente são extremamente heterogênicas sorologicamente, e apresentaram padrões de banda mais diversificados. A análise do PFGE nos revelou a existência de nove clusters (A até I) agrupando os isolados com similaridade \geq 85%. Nestes clusters, foram agrupados trinta e seis padrões únicos de banda (PPT), gerando um índice discriminatório de diversidade de 0,957. O cluster A englobou todas as amostras do sorovar O:3 biotipo 4 isoladas de animal e de casos humanos. Com base nos resultados, conclui-se que cepas com os mesmos perfis genotípicos, isolados de humanos e animais, do sorovar O:3 e biotipo 4, encontram-se circulantes por vários estados do Brasil. Além disso, com base no exposto, sugere-se que o suíno possa funcionar como principal elemento na cadeia de transmissão de *Y. enterocolitica* para o homem, por albergar cepas dos mesmos genótipos encontrados em infecções humanas.

Palavras chave: *Yersinia enterocolitica*, genes, virulência, antibiograma, PCR, ERIC, PFGE



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS ORIGINS IN BRAZIL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Leonardo Alves Rusak

Yersinia enterocolitica is been extensively studied since it has joined the family *Enterobacteriaceae* in 1972, for it is a pathogen of zoonotic origin, highly relevant for public health, widely spread in nature throughout water and animal reservoirs. The swine is the main reservoir, being a host of strains of the same bioserotypes found in humans. *Y. enterocolitica* has several pathogenicity genes, both chromosomal (*inv*, *ail* and *ystA*), and plasmidal (*virF*), thus being able to invade and survive inside a host organism. This study aims at analyzing strains of *Y. enterocolitica* from animal, food, environmental and human origin from several regions of Brazil, in order to trace the virulence genes above mentioned via PCR technique jointly with phenotypic tests, in addition to the analysis of antimicrobial susceptibility through disk-diffusion method, so together with the PCR results, we may evaluate its pathogenic potential. For the purpose of evaluating the phylogenetic diversity of strains there were used the ERIC-PCR and PFGE techniques. In a total of 60 strains, there were found 11 (18%) strains from serotypes O:3, biotype 4 of human and animal origin with all virulence genes. Ten human strains (O:3/B4) only show the 3 chromosomal genes, and 9 strains from Biotype 1A show gene *inv*. Regarding the resistance to antimicrobials, 60 (100%) strains were resistant to ampicillin, 58 (97%) to cefalotin, 6 (10%) to sulphametoxazole-thrimetroprim, 7 (12%) to tetracycline and 1 (2%) to amikacin. Five strains are found resistant to five antibiotics. ERIC-PCR found 32 ERIC genomic types (EGT), thus generating a discrimination index of diversity of 0.924. Forty strains from serotype O:3, biotype 4 of human, animal, food and environmental origins were grouped within 12 EGTs in a set with 85% of similarity. On the other hand, Biotype 1A strains isolated from food and environment are extremely heterogenic in terms of serology and have more diversified band profiles. The PFGE analysis has found nine clusters (from A to I), thus grouping the isolated strains with similarity $\geq 85\%$. Thirty-six single band profiles (PPT) were grouped from these clusters, thus generating a discrimination index of diversity of 0.957. Cluster A covered all strains from serotype O:3, biotype 4, isolated from animal and human cases. Based on the results, it is concluded that strains with the same genotype profiles, isolated from humans and animals, from serotype O:3 and biotype 4, are circulating throughout various Brazilian states. Also, the swine may act as the main element in the chain of transmission of *Y. enterocolitica* to humans, for it has strains from the same genotypes found in human infections.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, genes, virulence, antibiogram, PCR, ERIC, PFGE

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO.....	1
1.2 TAXONOMIA.....	2
1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FENOTÍPICAS	3
1.4 YERSINIOSE HUMANA.....	5
1.5 YERSINIOSE NOS ANIMAIS.....	7
1.6 A INFECÇÃO	8
1.7 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE GENOTÍPICOS.....	11
1.8 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE PLASMIDIAIS.....	12
1.9 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO	14
1.10 PROFILAXIA.....	14
1.11 TESTES FENOTÍPICOS	15
1.11.1 A autoaglutinação a 37° C, em caldo Clark & Lubs - VM/VP	15
1.11.2 Ligação ao cristal violeta.....	15
1.11.3 Meio CRMOX (Congo Red-Magnesium Oxalate Agar Medium).....	15
1.11.4 Atividade da Pirazinamidase (PYZ)	15
1.12 TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO	16
1.13 YERSINIOSE NO BRASIL	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Amostras Bacterianas.....	22
3.2 Caracterização Bioquímica.....	25
3.3 Caracterização Sorológica.....	26
3.4 Determinação dos fatores fenotípicos de virulência	26
3.4.1 Ligação ao Cristal Violeta (BHADURI <i>et al.</i> , 1987)	26

3.4.2	Autoaglutinação (SKURNIK <i>et al.</i> , 1984)	26
3.4.3	Comportamento em Ágar Vermelho de Congo - Oxalato de Magnésio (CRMOX - RILEY & TOMA, 1989)	27
3.4.4	Atividade da Pirazinamidase (PYZ) (KANDOLO & WAUTERS, 1985).....	28
3.5	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	29
3.6	Detecção dos fatores de virulência pela PCR	30
3.6.1	Extração do DNA bacteriano	30
3.6.2	Detecção dos genes de virulência	30
3.7	Consenso de repetição intergênica de Enterobactéria- PCR (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> - ERIC-PCR)	32
3.8	Eletroforese em Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - PFGE)	33
3.9	Cálculo do índice de diversidade das técnicas moleculares de tipagem.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Testes Fenotípicos, Testes de susceptibilidade a antimicrobianos e PCR dos genes de virulência.....	38
4.2	ERIC-PCR	42
4.3	PFGE.....	44
5	DISCUSSÃO	46
6	PERSPECTIVAS	56
7	CONCLUSÕES	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa genético do plasmídeo de virulência pYV de 70 kb de <i>Y. enterocolítica</i> O:3. (MICHIELS <i>et al.</i> , 1991).....	13
Figura 2 - Meio CRMOX com colônias positivas (vermelhas) e colônias negativas (brancas).....	28
Figura 3 - Gel representativo dos genes de virulência que amplificaram na PCR	32
Figura 4 - Fórmula do índice de diversidade de Simpson	37
Figura 5 - Dendrograma gerado a partir dos genótipos (EGTs) das 60 amostras obtidas pelo ERIC-PCR.....	43
Figura 6 - Dendrograma construído a partir da análise das bandas, gerando clusters com similaridade de $\geq 85\%$ das 60 amostras obtidos pelo PFGE.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Novas espécies de <i>Yersinia</i> propostas.....	3
Tabela 2 - Informações completas dos isolados	23
Tabela 3 - Biotipificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> segundo Wauters et al.(1981) e Mollaret et al. (1990).....	25
Tabela 4 - Primers dos genes de virulência <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>virF</i> e <i>ystA</i> e seus respectivos amplicons.....	31
Tabela 5 - Enzimas de restrição <i>Not I</i> e <i>Xba I</i> e seus reagentes.....	36
Tabela 6 - Resultados do antibiograma (TSA), PCR dos genes de virulência e testes fenotípicos das 60 amostras de <i>Y. enterocolitica</i> analisadas.....	38
Tabela 7 - Resultado dos testes fenotípicos de acordo com o sorotipo/biotipo das 60 amostras.	40
Tabela 8 - Frequência dos genes de virulência nas 60 amostras	40
Tabela 9 - Frequência dos genes de virulência por sorotipos/biotipos das 60 amostras.	41
Tabela 10 - Frequência dos genes de virulência por fonte de isolamento das 60 amostras	41
Tabela 11 - Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos nas 60 amostras	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	Graus centígrados
µg	micrograma
µL	microlitro
Ail	<i>Attachment invasion locos</i>
<i>ail</i>	attachment invasion locos gene
AK	Amicacina
AL	alimento
AM	ambiente
AMP	Ampicilina
AN	animal
APA	água peptonada alcalina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Autoag.	autoaglutinação
BA	Bahia
BH	Belo Horizonte
<i>blaA</i>	Gene β-lactamases A
<i>blaB</i>	Gene β-lactamases B
BSA	bovine serum albumin
C	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CLB	Tampão de Lise Celular
CLIST	Coleção de <i>Listeria</i>

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicina
CRMOX	<i>Congo Red-Magnesium Oxalate Agar Medium</i>
CSB	Tampão de Suspensão celular
CV	Cristal violeta
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGT	ERIC genótipo
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
<i>et al</i>	e outros
FOX	Cefoxitina
g	gramas
GMP _c	Monofosfato cíclico de guanosina
h	horas
hemocomp.	hemocomponente
HU	humana
Inv	Invasina
<i>Inv</i>	<i>invasive gene</i>
IPM	Imipenem
kb	kilobase
KF	Cefalotina
LACEN	Laboratório Central
M	molar
MG	Minas Gerais

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
N°	número
ng	nanogramas
nm	nanômetro
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
<i>Not I</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> is the genomic source (Enzima de restrição)
NT	não tipável
ODC	ornitina descarboxilase
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PPT	PFGE pulstotipo
PR	Paraná
pYV	<i>plasmid Yersinia Virulence</i>
PYZ	Atividade da Pirazinamidase
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
REAC	<i>Restriction Enzyme Analysis of Chromosomes</i>
REAP	<i>Restriction Enzyme Analysis of Plasmids</i>
RJ	Rio de Janeiro

RL	Sulfametoxazol
rpm	rotações por minuto
SC	Santa Catarina
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SES/SP	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
SP	São Paulo
ST I	Toxina termoestável tipo I
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TA	temperatura ambiente
Tampão TE	Tris-EDTA-água
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus polimerase</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tetraciclina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	teste de sensibilidade aos antibióticos
U	unidade
UPGMA	unweighted pair group method with averages
V	volt
VM/VP	Vermelho de Metila e Voges-Proskauer
W	Trimetoprim
<i>Xba I</i>	<i>Xanthomonas badrii is the genomic source</i> (Enzima de restrição)
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
YlpA	<i>Yersinia lipoprotein A</i>
Yops	<i>Yersinia outer membrane proteins</i>
<i>ystA</i>	<i>yersinia stable toxin gene</i>
µm	micrometro

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O patógeno conhecido hoje como *Yersinia enterocolitica*, foi isolado pela primeira vez em 1923, nos Estados Unidos. McIver e Pike, em 1934, também nos Estados Unidos, descreveram-no como um cocobacilo Gram negativo e lhe deram o nome de *Flavobacterium pseudomallei*. Ele foi isolado de dois abscessos faciais (similar ao mormo) de um fazendeiro de 54 anos. Em 1943, Schleifstein e Coleman, observando que esse micro-organismo havia sido isolado de conteúdo entérico, propuseram o nome de *Bacterium enterocoliticum* (BOTTONE, 1997; BOTTONE, 1999). Pouco se ouviu sobre *Bacterium enterocoliticum* por volta de 20 anos após a sua descoberta, até o início dos anos 60, quando microbiologistas clínicos e veterinários começaram a relatar o isolamento de uma nova bactéria a qual propuseram diversos nomes como: *Pasteurella pseudotuberculosis-like*, *Pasteurella pseudotuberculosis type B*, *Pasteurella X*, *Pasteurella Y* e Germe X (SWAMINATHAN *et al.*, 1982). A *Pasteurella X* descoberta por Frederiksen (1964) e os isolados de Hassig *et al.* (1949) eram muito parecidos com o *Bacterium enterocoliticum* de Schleifstein e Coleman. Logo Frederiksen, em 1964, propôs o epíteto *enterocolitica* para a nova bactéria do gênero *Yersinia*, introduzida na família *Enterobacteriaceae* pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, em 1972, embora o gênero *Yersinia* já tivesse sido estabelecido por Van Loghem em 1944. Este nome foi dado em homenagem a Alexandre Émile Jean Yersin, que descreveu, pela primeira vez, o bacilo da peste (SWAMINATHAN *et al.*, 1982; BOTTONE, 1997; FALCÃO & FALCÃO, 2006; PAIXÃO, 2010).

A *Yersinia enterocolitica* é hoje reconhecida como um patógeno de natureza zoonótica com relevância em saúde pública, amplamente distribuído na natureza em reservatórios aquáticos e fontes animais (BOTTONE, 1997; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2011).

No transcurso da história sobre a *Y. enterocolitica* observa-se que várias espécies de animais domésticos e selvagens estão envolvidas, sendo o suíno a principal fonte de infecção no ciclo epidemiológico, principalmente na figura de cepas dos mesmos biosorotipos encontrados em humanos (MENDONÇA *et al.*, 1995).

1.2 TAXONOMIA

O gênero *Yersinia* é atualmente composto por doze espécies, das quais três espécies são patogênicas para o homem e os animais, são elas: *Yersinia pestis* (agente da peste bubônica), *Yersinia pseudotuberculosis* (bacilo de Malassez e Vignal) e *Yersinia enterocolitica* (MOLLARET *et al.*, 1990; BOTTONE, 1999). Já as outras nove são: *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia ruckeri*, *Yersinia aldovae* (SULAKVELIDZE, 2000) e *Yersinia aleksiciae* (SPRAGUE & NEUBAUER, 2005), conhecidas como *Y. enterocolitica* “like” ou *Y. enterocolitica* atípicas (MERHEJ *et al.*, 2008). Elas receberam essa denominação pois, através de estudos de hibridização de DNA, ficou comprovado serem cepas que diferem bioquimicamente das amostras típicas de *Yersinia enterocolitica* (BOTTONE, 1999; FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Nos últimos anos, alguns autores propuseram a inclusão de novas espécies ao gênero *Yersinia*, conforme a tabela a seguir (Tabela 1):

Tabela 1 - Novas espécies de *Yersinia* propostas.

Espécie	Fonte	País	Manifestação Clínica	Referência
<i>Y. massiliensis</i>	Água/Hospital	França	Não	MERHEJ <i>et al.</i> , 2008
<i>Y. similis</i>	Animais/Ambiente/Água	Alemanha	Não	SPRAGUE <i>et al.</i> , 2008
<i>Y. entomophaga</i>	Larva (<i>Costelytra zealandica</i>)	Nova Zelândia	Não	HURST <i>et al.</i> , 2011
<i>Y. pekkanenii</i>	Água/Solo/Alface	Finlândia	Não	MURROS-KONTIAINEN <i>et al.</i> , 2011-a
<i>Y. nurmii</i>	Pacotes de carne de frango	Finlândia	Não	MURROS-KONTIAINEN <i>et al.</i> , 2011-b

1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FENOTÍPICAS

Yersinia enterocolitica é um micro-organismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, cuja característica morfotintorial é de um pequeno bacilo Gram-negativo, não esporulado, por vezes com coloração bipolar, móvel de 22 a 30°C e, fisiologicamente, se caracteriza como anaeróbio facultativo. Ela mede cerca de 0,5 x 0,8 µm de largura por 1 x 3 µm de comprimento. Em culturas jovens a 25°C predominam formas cocóides (coco-bacilos). Além disso, a essa temperatura, ela possui flagelos peritríqueos. Já em culturas mais antigas, a uma temperatura de 37°C, os bacilos tendem a ser pleomórficos e naturalmente imóveis. É capaz de se multiplicar em temperaturas que variam de 4 a 45°C, situando a faixa ótima entre 25 a 28°C. Possui a capacidade de resistir ao congelamento, sobrevivendo em alimentos armazenados sob refrigeração (MOLLARET *et al.*, 1990; BOTTONE, 1999; FALCÃO & FALCÃO, 2006; FÀBREGA & VILA, 2012).

Devido a sua capacidade de se multiplicar a 4°C (psicotrófica), faz com que seja reconhecida como um importante patógeno alimentar (MOLLARET, 1982), embora seja inativada por pasteurização (71,8°C por 30 segundos). O pH ótimo para o seu crescimento se situa entre 7,2 e 7,6; no entanto, é capaz de crescer em uma faixa de pH que vai de 4 até 10 (FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Y. enterocolitica está dividida em 5 biotipos, 10 fagotipos e mais de 60 sorotipos definidos pelos antígenos somáticos e flagelares, dentre os quais o grau de patogenicidade é variável e, tendo como maior prevalência nas infecções zoonóticas os sorotipos O:3 e O:9, que são frequentemente isolados de suínos normais (portadores) e doentes (CORNELIS *et al.*, 1987; CARNIEL & MOLLARET, 1990; MILLER, 1992).

Os biotipos patogênicos para o homem e os animais são 1B, 2, 3, 4 e 5, já o biotipo 1A é atribuído aos isolados do meio ambiente e são geralmente considerados não patogênicos (BOTTONNE, 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2011). Os sorogrupos O:3, O:5, 27, O:8 e O:9 incidem predominantemente como agentes causadores de doença no homem (FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Há uma grande correlação entre bio-soro-fagotipos de *Y. enterocolitica* e dessas características com o tipo de hospedeiro e a região de isolamento. O sorotipo O:3 é encontrado com maior frequência em casos clínicos humanos e isolados de suínos no Brasil e geralmente está associado ao biotipo 4 e fagotipo VIII. Esse bio-soro-fagotipo também é o predominante em vários países da Europa, no Japão, Canadá e África do Sul (BOTTONNE, 1997; FALCÃO & FALCÃO, 2006).

A susceptibilidade de *Y. enterocolitica* a uma gama de antibióticos tem sido evidenciada nos últimos anos, apresentando sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração e cefamicinas, aos aminoglicosídeos e ao trimetoprim-sulfametoxazol (FALCÃO & FALCÃO, 2006; FALCÃO *et al.*, 2006). No entanto, foram descritas cepas com resistência a alguns antibióticos β -lactâmicos como: ampicilina, carbenicilina e cefalotina (BAUMGARTNER *et al.*, 2007; FALCÃO & FALCÃO, 2006). Essa resistência aos β -lactâmicos pode estar associada à presença de dois genes cromossomiais conhecidos como *blaA* e *blaB*, os quais são responsáveis pela produção de duas β -lactamases: A e B, respectivamente. A

presença e a expressão dessas β -lactamases variam de acordo com o biotipo e sua distribuição geográfica. Cepas do biotipo 4 provenientes da Europa, Ásia, Brasil e África do Sul costumam expressar as duas enzimas, enquanto que amostras provenientes da Austrália e Nova Zelândia expressam somente *blaA* (BONKE *et al.*, 2011). Além da resistência aos antimicrobianos supracitados, já foram encontradas cepas de *Yersinia enterocolitica* com alta resistência à amoxicilina + ácido clavulânico e eritromicina (BONARDI *et al.*, 2010). Contudo, a resistência a múltiplos agentes antimicrobianos é um evento raro. Apesar disso, já foram encontradas cepas resistentes a até seis antibióticos (BAUMGARTNER *et al.*, 2007).

O tratamento com antibióticos, na maioria dos casos de yersiniose humana, não é recomendado por se tratar, em grande parte dos casos, de uma gastroenterite auto-limitada (BONKE *et al.*, 2011). Mas nos casos em que a terapêutica é realizada, a Organização Mundial de Saúde recomenda como tratamento antimicrobiano inicial: tetraciclina, cloranfenicol e gentamicina (FÀBREGA & VILA, 2012). Além dos supracitados, trimetoprim-sulfametoxazol e fluoroquinolonas também são utilizados na terapêutica dessa doença (BONKE *et al.*, 2011). Recentemente, compostos mais novos como as cefalosporinas de terceira geração e as, anteriormente citadas, fluoroquinolonas, têm sido consideradas melhores alternativas na terapêutica (FÀBREGA & VILA, 2012).

1.4 YERSINIOSE HUMANA

Em 1960, infecções humanas por *Y. enterocolitica* começaram a ser relatadas em vários países europeus como França, Bélgica, Holanda, Alemanha, Suíça, Suécia, dentre outros. Posteriormente, começaram a aparecer relatos ao redor do

mundo como nos Estados Unidos em 1965, no Canadá e África do Sul em 1966, no Congo Belga em 1967, no Japão em 1972 e no Irã em 1976 (MOLLARET, 1995).

O primeiro grande surto em humanos ocorreu no ano de 1976 no Estado de Nova York, acometendo 222 pessoas, dentre crianças e trabalhadores de cinco escolas, que haviam consumido leite achocolatado contaminado (BOTTONNE, 1999).

A literatura registra um polimorfismo de sinais e sintomas como: febre, diarreia, náuseas, vômitos e dores abdominais; tendo, portanto, um perfil clínico que abrange desde uma gastroenterite autolimitada até uma septicemia fatal (ZHENG *et al.*, 2008). Salienta-se que a septicemia não é uma complicação comum em decorrência de uma infecção por *Y. enterocolitica*; no entanto, quando ocorre, pode levar a óbito em 30 a 60% dos casos. Os fatores conhecidos que são capazes de levar ao desenvolvimento de septicemia por *Yersinia* são: imunossupressão, discrasia sanguínea, má nutrição, insuficiência renal crônica, cirrose, alcoolismo, diabetes mellitus e excesso de ferro, principalmente naqueles pacientes em tratamento com desferroxamina B. As complicações extra-intestinais, além da septicemia, compreendem abscessos no fígado e no baço, pneumonia, artrite séptica, meningite e endocardite (ZHENG *et al.*, 2008).

Embora a yersiniose, na maioria dos casos, seja autolimitada e não deixe sequelas, poderá também desencadear complicações autoimunes. As complicações imunológicas decorrentes desse quadro incluem: artrite reativa, eritema nodoso, iridociclite, glomerulonefrite, miocardite e tireoidite (BOTTONNE, 1999).

Na maioria das vezes, *Y. enterocolitica* é transmitida ao homem através da ingestão de carne de porco mal cozida, leite, água e até tofu (ZHENG *et al.*, 2008), inclusive com relatos de transmissão através da transfusão de sangue (THIBODEAU *et al.*, 1999). Em 1999, Bottone citou 49 casos de *Y. enterocolitica* associados à transfusão de sangue em países da Europa, Estados Unidos, África do Sul, Austrália

e Nova Zelândia. Todos esses casos ocorreram nas décadas de 70, 80 e 90, e tiveram como maior prevalência os sorotipos O:3 e O:9.

Y. enterocolitica é uma das causas de bacteremia associada à transfusão e morte do receptor. Isso decorre da propriedade psicotrófica da *Y. enterocolitica*, quando presente no sangue a ser doado, pois é capaz de se multiplicar no período de estocagem, sem alterar a aparência do sangue (BOTTONNE, 1997:1999).

1.5 YERSINIOSE NOS ANIMAIS

A partir de 1960, infecções por *Y. enterocolitica* começaram a ser observadas em animais. Foram relatados numerosos surtos epizooticos, disseminando-se principalmente em colônias de chinchilas e de lebres na Europa e nos Estados Unidos. Posteriormente, dados epidemiológicos mostraram que a infecção ocorria em roedores, na maioria das vezes, na forma subclínica e em suínos e bovinos na forma clínica e subclínica (MOLLARET, 1995; FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Além dos supracitados, outros animais já foram relacionados como portadores de *Y. enterocolitica*, exemplificando-se caprinos, ovinos e galináceos; animais selvagens como lebre, guaxinim, raposa e porco-espinho; aves aquáticas e animais domésticos como gatos e cães (BOTTONNE, 1999). Inclusive, com relação a estes últimos, foi publicado um trabalho em 2011 demonstrando em cães a forma hepática de yersiniose, na Coreia (WON BYUN *et al.*, 2011).

A via oral é a principal forma de contaminação dos animais, adquirida através da ingestão de alimentos, inclusive vegetais, água e solo, albergando *Yersinia* eliminada pelas fezes de animais portadores. Outros mecanismos de propagação da bactéria são descritos na literatura, ressaltando-se o problema advindo nos

abatedouros e na indústria de processamento de carnes, resultado da presença de portadores hígidos (PILON *et al.*, 2000).

A infecção por *Yersinia enterocolitica* no suíno pode causar quadros clínicos entéricos graves e, em menor proporção, ao nível extraintestinal (AHVONEN *et al.*, 1973). Um fato interessante observado é o número elevado de suínos que são portadores assintomáticos, tornando-os uma importante fonte de infecção e de propagação nas diversas biocenoses (ADESIYUN *et al.*, 1992). Além de infectar o suíno, a bactéria, de característica cosmopolita, se constitui em fonte de infecção de um número elevado de hospedeiros, que funcionam como doentes ou portadores são (MOLLARET *et al.*, 1990).

Diante do exposto, o suíno e seus produtos, ocupam uma posição de destaque como fonte de infecção e de veiculação de *Yersinia enterocolitica* para os seres humanos (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

1.6 A INFECÇÃO

A epidemiologia das infecções por *Y. enterocolitica* é complexa e ainda não foi muito bem elucidada (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

A infecção se inicia tipicamente pela ingestão de alimentos ou água contaminados e a colonização da bactéria no trato entérico. A maioria dos alimentos incriminados em surtos por *Y. enterocolitica* obedecem a um ciclo que vai desde a temperatura de refrigeração, a qual favorece o crescimento da bactéria, até a temperatura do corpo humano. A bactéria é submetida a essa mudança de temperatura adaptando-se àquela do corpo humano, para dar início ao processo de infecção (BOTTONNE, 1999). Esse gradiente de temperatura é um passo importante

na patogênese, pois a bactéria utiliza fatores cromossômicos e plasmidiais de virulência que são dependentes da temperatura (BOTTONNE, 1999).

O primeiro evento da patogênese é a colonização no trato intestinal, particularmente do intestino delgado distal (íleo terminal) e do cólon proximal. Por esta razão, a maioria dos efeitos patológicos e das manifestações clínicas ocorre nesse sítio anatômico. O tecido linfoide intestinal também é um dos principais alvos da infecção, embora regiões intestinais adjacentes e os linfonodos mesentéricos sejam também envolvidos com frequência.

Y. enterocolitica manifesta tropismo por tecido linfoide de maneira similar a *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* (FÀBREGA & VILA, 2012). A maioria das células bacterianas permanece no lúmen intestinal enquanto uma minoria se adere ao epitélio da mucosa, não mostrando preferência particular por qualquer tipo celular. Já as bactérias que invadem o tecido, pelo contrário, preferencialmente o fazem através das células M (grupo especial de células epiteliais foliculo associadas). Estas têm a função de capturar o micro-organismo, resultando na multiplicação das bactérias nas placas de Peyer (PUJOL & BLISKA, 2005).

Três proteínas atuam como elementos principais no processo de adesão e invasão das células epiteliais e constituem o passo inicial para invasão da mucosa intestinal. A invasina chamada Inv é o principal determinante e desempenha um papel vital promovendo a entrada da bactéria nas células epiteliais. A YadA é uma proteína plasmidial que tem sido descrita como o principal fator de adesão, essencial para indução da doença como, por exemplo, a inflamação e a necrose no fígado. Trata-se de uma proteína multifacetada que media a adesão às células epiteliais, fagócitos e componentes da matriz extracelular. Além disso, protege a bactéria de ser morta pelos neutrófilos. Após a invasão, a YadA é predominante para adesão ao tecido infectado e é necessária para persistência, sobrevivência e

replicação nas placas de Peyer, sendo ainda atribuída certa habilidade de invasão, que só é detectável após a inativação da Inv.

A terceira proteína é a Ail, que é diretamente relacionada à virulência, pois é detectada com frequência entre as cepas patogênicas. Está envolvida no processo de adesão e invasão de uma cultura de células de tecido específico, bem como na sobrevivência contra o efeito bactericida do complemento (SKURNIK *et al.*, 1984; FÀBREGA & VILA, 2012).

Uma vez internalizadas, as bactérias são transportadas através da barreira epitelial e expelidas pelo lado basolateral das células M. Evidências sugerem que nos passos iniciais da infecção, fagócitos internalizam a bactéria. Esse micro-organismo internalizado supostamente se replica dentro dos macrófagos, e presume-se que elas sejam transportadas pelos fagócitos migrantes para os linfonodos mesentéricos, resultando em uma linfadenite mesentérica (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b; FÀBREGA & VILA, 2012). Além disso, os fagócitos portadores da bactéria podem disseminá-la, via corrente sanguínea, para o fígado e o baço. Uma vez localizada nas placas de Peyer, nos linfonodos mesentéricos, no baço ou no fígado, *Y. enterocolitica* pode se multiplicar de forma extracelular, dentro dos micro abscessos. Neles, a bactéria forma microcolônias e parece ser resistente à fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos (FÀBREGA & VILA, 2012).

Os ensaios experimentais da infecção oral por *Y. enterocolitica* em suínos por um período de até 72 horas demonstraram que ela pode colonizar os tecidos das tonsilas palatinas, linfonodos retrofaríngeos, esôfago, estômago, fígado, baço, duodeno, jejuno, íleo, cólon e os linfonodos mesentéricos. O tecido mais confiável para se identificar uma infecção por *Y. enterocolitica* são as tonsilas palatinas, cujo isolamento ainda é possível, mesmo algumas semanas ou meses após ter cessado

a sua eliminação ou presença nas fezes. A retirada das tonsilas palatinas durante o processamento da carne do suíno no abatedouro pode ser realizada na tentativa de se minimizar a contaminação para a carcaça e produtos derivados. Essa técnica já é realizada em alguns países (THIBODEAU *et al.*, 1999). Sua preservação nas tonsilas e sua capacidade de se multiplicar a uma temperatura de 4°C (temperatura de estocagem) fizeram com que *Y. enterocolitica* se tornasse um importante patógeno de origem alimentar (MOLLARET, 1982).

1.7 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE GENOTÍPICOS

Os mecanismos de patogenicidade de *Y. enterocolitica* O:3 são muito complexos e diversos fatores cromossômicos já foram identificados (LEAL, 1996). No seu cromossomo, *Y. enterocolitica* O:3 patogênica possui o gene conhecido como *inv* (*invasive gene*), responsável pela produção da invasina, que é uma proteína localizada na parte externa da membrana. Ela é o primeiro fator de invasão das células, recrutada para uma eficiente translocação da bactéria através do epitélio intestinal (RASMUSSEN *et al.*, 1994). Outro gene cromossomial que também atua na invasão de células eucariotas por *Y. enterocolitica* O:3 é o *ail* (*attachment invasion locus*), que codifica uma proteína de membrana externa (Ail), responsável pela fixação ao locus de invasão que media a invasão celular (MILLER *et al.*, 1990). Além disso, essa proteína confere a capacidade de resistir à ação bactericida do complemento a 37°C (BLISKA & FALKOW, 1992).

Por último, o gene *ystA* (*yersinia stable toxin*) é responsável pela produção de uma enterotoxina termoestável de baixo peso molecular, que causa diarreia, devido à ativação de uma forma particular da guanilatociclase, aumentando, assim, os níveis de GMP_c no intestino. A atividade dessa toxina leva a um acúmulo de líquidos

no lúmen intestinal (REVELL & MILLER, 2001). As propriedades físico-químicas, antigênicas e o modo de ação dessa toxina são similares às da toxina termoestável STI da *Escherichia coli* (PAI & MORS, 1978; BOYCE *et al.*, 1979). Entretanto, esse gene é encontrado somente em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica*, fato que o torna um importante marcador de cepas potencialmente virulentas (IBRAHIM *et al.*, 1997).

1.8 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE PLASMIDIAIS

O outro fator de patogenicidade encontrado em *Y. enterocolitica* O:3 é a presença de um plasmídeo denominado pYV - *plasmid Yersinia Virulence* (**Figura 1**) - de cerca de 70 kb e indispensável à virulência (GEMSKI *et al.*, 1980; PORTNOY & FALKOW, 1981). Esse plasmídeo confere dependência ao Cálcio a 37°C (GEMSKI *et al.*, 1980), desaparecendo a dependência quando a bactéria é cultivada a uma temperatura inferior a 37°C (ZAHORCHAK & BRUBAKER, 1982). Além disso, o plasmídeo codifica a produção de várias proteínas denominadas Yops (*Yersinia outer membrane proteins*) (PORTNOY *et al.*, 1984), que têm como efeitos sobre os macrófagos: a inibição da fagocitose, do *burst* respiratório, da produção de citocina pró-inflamatória e da apoptose. Nos leucócitos polimorfonucleares provocam a resistência à fagocitose e a morte pelos peptídeos antimicrobianos. Nas células epiteliais causam citotoxicidade e alteração da resposta à liberação da citocinas que são liberadas no meio de cultura (FALCÃO & FALCÃO 2006) e de duas proteínas de membrana externa: uma adesina, denominada YadA (BÖLIN *et al.*, 1982) e uma lipoproteína denominada YlpA (CHINA *et al.*, 1990). Em cultura *in vitro*, esse plasmídeo pode ser perdido, dependendo das condições do meio de cultura e da temperatura da incubação. Há uma maior probabilidade de ser perdido a uma

1.9 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO

O diagnóstico pode ser firmado através do isolamento do micro-organismo da amostra suspeita de fezes, sangue, vômito, líquor e apêndice, quando ocorre uma apendicectomia. Para tanto pode-se utilizar o Ágar MacConkey, o qual é destinado para o crescimento de bactérias Gram negativas ou Ágar Hektoen.

A colônia suspeita é inoculada no meio SIM, o qual é utilizado para se observar a produção de sulfeto, indol e motilidade. Seguido da identificação bioquímica segundo Wauters *et al.* (1981) e Mollaret *et al.* (1990) e diagnóstico sorológico através de teste de aglutinação (ASENSI & HOFER, 1985) ou ELISA (Manual das doenças transmitidas por alimentos e água).

1.10 PROFILAXIA

As medidas profiláticas principais para evitar a contaminação por *Y. enterocolitica* são as boas práticas de higiene no preparo dos alimentos. Deve-se evitar o consumo de carnes cruas ou mal cozidas; principalmente de bovinos, suínos e aves; de água não tratada e leite não pasteurizado.

Orienta-se a boa lavagem das mãos aos preparadores de alimentos, principalmente no manuseio de carne de suíno, tentando evitar a contaminação cruzada.

Deve-se proteger os alimentos e a água contra animais, principalmente na figura dos roedores, para evitar a contaminação por suas fezes.

Além disso, deve-se remover a cabeça e o pescoço do suíno durante o processo de abate, para evitar a contaminação da carne pelas tonsilas palatinas, as quais são altamente colonizadas (THIBODEAU *et al.*, 1999; Manual das doenças transmitidas por alimentos e água).

1.11 TESTES FENOTÍPICOS

Na literatura são descritos vários testes fenotípicos presuntivos para se analisar a presença do plasmídeo de virulência em *Y. enterocolitica* tais como:

1.11.1 A autoaglutinação a 37°C, em caldo Clark & Lubs - VM/VP

Dependendo da forma de crescimento obtida, revela as cepas que apresentam o plasmídeo de virulência. Os fatores plasmidiais associados à superfície da bactéria, como: uma cadeia polipeptídica denominada P1, o crescimento dependente de cálcio a temperatura de 37°C e a produção do antígeno VW são fatores essenciais para a autoaglutinação (SKURNIK *et al.*, 1984).

1.11.2 Ligação ao cristal violeta

Utilizada para detecção do plasmídeo de virulência de forma rápida, exteriorizada pela capacidade daquelas cepas virulentas de fixar o corante na fase de crescimento exponencial (BHADURI *et al.*, 1987)

1.11.3 Meio CRMOX (Congo Red-Magnesium Oxalate Agar Medium)

No meio CRMOX, detecta-se a expressão de virulência associada à dependência do cálcio e a absorção do Vermelho de Congo. Esse meio foi elaborado através da associação de dois outros testes utilizados para a detecção de cepas virulentas: o Agar Oxalato de Magnésio e Agar Vermelho de Congo (RILEY & TOMA, 1989).

1.11.4 Atividade da Pirazinamidase (PYZ)

O teste fenotípico da atividade da Pirazinamidase baseia-se na hidrólise da pirazinamida pela pirazina-carboxilamidase (pirazinamidase), resultando na

produção do ácido pirazinóico, o qual, na presença de sais ferrosos, adquire uma cor rosada. O teste originalmente relatado para as diferenciações de espécies do gênero *Mycobacterium* sofreu uma adaptação para *Y. enterocolitica*, distinguindo as potencialmente virulentas (PYZ⁻) das não virulentas (PYZ⁺). Apesar de todas as cepas que possuem o plasmídeo serem PYZ⁻, o teste não está diretamente ligado à presença do plasmídeo. Ele apenas demonstra a capacidade de uma cepa abrigar o plasmídeo, sem substituir outros testes fenotípicos capazes de detectá-lo. No entanto, o teste é rotineiramente utilizado para a discriminação de amostras virulentas (KANDOLO & WAUTERS, 1985).

1.12 TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO

Diversas técnicas moleculares, para tipagem epidemiológica, vêm sendo utilizadas em estudos epidemiológicos de surtos (FALCÃO *et al.*, 2006). Normalmente, uma única célula bacteriana dá origem a uma progênie, que desencadeia um surto. Essa progênie é idêntica ou geneticamente muito similar ao organismo fonte da infecção, logo essas técnicas possibilitam especular sobre a origem de um surto (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

Todos os organismos dentro de uma espécie podem ser tipados, e a técnica utilizada para fazê-lo deve apresentar uma alta reprodutibilidade e um bom poder discriminatório (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

A genotipagem em *Y. enterocolitica* teve um grande avanço nas últimas décadas, e vários métodos baseados no DNA vêm sendo utilizados para caracterização dessas cepas (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

As técnicas mais utilizadas atualmente para a tipagem de cepas de *Y. enterocolitica* são: a técnica de análise de DNA plasmidial usando endonuclease de restrição (*Restriction Enzyme Analysis of Plasmids* - REAP), análise de DNA cromossomial usando endonuclease de restrição (*Restriction Enzyme Analysis of Chromosomes* - REAC), amplificação aleatória do DNA polimórfico (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - RAPD), ribotipagem (*Ribotyping*) e eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) (WOJCIECH *et al.*, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006).

A técnica consenso de repetição intergênica de Enterobactéria (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR) não é tão utilizada quanto as supracitadas (FALCÃO *et al.*, 2006). No entanto, a análise da distribuição desses elementos repetitivos no DNA de micro-organismos pode ser uma ferramenta útil para uma rápida identificação de espécies bacterianas, além de ser útil para a análise do genoma de procariontes (VERSALOVIC *et al.*, 1991). Alguns trabalhos já demonstraram o êxito dessa técnica na diferenciação de cepas de *Y. enterocolitica* (SACHDEVA & VIRDI, 2004; WOJCIECH *et al.*, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b). As principais vantagens do ERIC-PCR são a sua simplicidade, menor custo e maior rapidez em ser realizado, quando comparado com as outras técnicas (SOUZA *et al.*, 2010).

A técnica do PFGE é uma variação da eletroforese em gel de agarose que permite a análise de fragmentos de DNA de grande tamanho do genoma inteiro de uma bactéria, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados (MAGALHÃES *et al.*, 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b). Esta técnica se utiliza de diversas enzimas de restrição que fragmentam o DNA todo de um micro-organismo, gerando perfis distintos que serão analisados no computador. Esta metodologia demonstrou um alto poder discriminatório e superior

as técnicas supracitadas (LUKINMAA *et al.*, 2004; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

O PFGE é utilizado tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo micro-organismos de diferentes países, ou regiões, aumentando assim o escopo epidemiológico desta técnica (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

É o padrão ouro no que tange subtipagem de bactérias, e a enzima de restrição utilizada com mais frequência em *Y. enterocolitica* é a *Not I* (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

Os fatores que limitam a utilização do PFGE são: o tempo envolvido na completa análise dos dados e os equipamentos que são sofisticados e caros (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b; SOUZA *et al.*, 2010).

1.13 YERSINIOSE NO BRASIL

Surto causado por *Yersinia enterocolitica* vêm sendo relatados ao redor do mundo há décadas. No Brasil, a ocorrência de *Y. enterocolitica* não é tão descrita quanto em outros países. Tal fato deve-se provavelmente a não utilização das técnicas ideais para isolamento e caracterização dessa bactéria, ou a baixa incidência desse micro-organismo no nosso meio. Porém, vários estudos realizados no nosso país com *Y. enterocolitica* e outras espécies de *Yersinia* mostram seu isolamento a partir de material clínico humano, animal, alimentos e meio ambiente (FALCÃO & FALCÃO, 2006). Aqui, ela é relatada com mais frequência em casos isolados, e a maioria das infecções por *Y. enterocolitica* apresentam um quadro clínico de diarreia. No entanto, outras manifestações clínicas já foram relatadas

como: anemia falciforme, pneumonia, adenopatia, manifestações cutâneas, artrite e em menor frequência talassemia (FALCÃO & FALCÃO, 2006).

O Brasil ainda não possui dados oficiais de ocorrência de yersiniose causada por *Y. enterocolitica*. Esse detalhe fica restrito aos trabalhos publicados como o retratando os isolamentos de amostras de clínicas humanas na cidade de São Paulo (CECCARELLI *et al.*, 1990), no Rio Grande do Sul, registram-se os isolados de suínos com diarreia (CASTRO *et al.*, 1983), no Rio de Janeiro, a *Y. enterocolitica* foi detectada em suínos, no homem e em cães saudáveis (ASENSI & HOFER, 1985, 1986; NUNES & RICCIARDI, 1986; MENDONÇA *et al.*, 1994). Em um trabalho realizado nos municípios de Itaguaí, Seropédica e Rio de Janeiro (Santa Cruz), foi analisado o nível de aglutininas anti-*Yersinia enterocolitica* O:3 em soros de suínos saudáveis, através da prova de soro-aglutinação lenta, positivando-se em 63% dos suínos reatores analisados (LÁZARO & HOFER, 1996), dentre outros trabalhos.

Já outros países, como os Estados Unidos, registram uma média de 17 mil casos anuais de yersiniose. Mas, mesmo a yersiniose não despertando tanta atenção do governo em nosso meio, cita-se a conduta da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - SES/SP Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE, que mantém uma página na internet na parte de manual das doenças transmitidas por alimentos e água (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/yersi_entero.htm) específica falando sobre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, demonstrando assim o caráter emergente dessa doença que tem importância tanto em saúde pública, como também na parte veterinária e de alimentos.

Diante do exposto, fica evidente que o estudo dos fatores de virulência pode ajudar a entender melhor a dinâmica da doença, assim como para melhoria de

terapêutica dessa infecção, bem como nos revelar o potencial de patogenicidade das cepas circulantes no nosso país.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo geral analisar o perfil de virulência de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diversas fontes (humana, animal, alimento e ambiental) através de métodos fenotípicos e genotípicos (fatores cromossomiais e plasmidiais) bem como a susceptibilidade aos antimicrobianos e o polimorfismo genético desses isolados.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar, através de métodos fenotípicos e genotípicos, os fatores de virulência das cepas estudadas;
- Comparar os resultados obtidos nos testes fenotípicos com os moleculares (PCR e análise plasmidial);
- Avaliar a correlação filogenética dessas cepas através do ERIC-PCR;
- Avaliar o polimorfismo genético dos isolados através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Foram estudados 60 isolados, pertencentes à Coleção de *Listeria* (CLIST), identificados, pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/ Setor Listeria, como *Yersinia enterocolitica*. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C). As informações completas desses isolados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações completas dos isolados.

Amostras	N° Coleção	Origem	Fonte	Data da	
				Coleta	Sorovar/Biotipo
YE1	IOC 02/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	01/08/2007	O:3/4
YE2	IOC 08/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	01/08/2007	O:3/4
YE3	IOC 12/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	01/08/2007	O:3/4
YE4	IOC 68/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE5	IOC 73/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE6	IOC 78/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE7	IOC 126/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE8	IOC 128/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE9	IOC 133/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	28/09/2007	O:3/4
YE10	IOC 192/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE11	IOC 195/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE12	IOC 199/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE13	IOC 222/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE14	IOC 231/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE15	IOC 236/07	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	19/10/2007	O:3/4
YE16	IOC 02/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE17	IOC 04/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE18	IOC 10/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE19	IOC 25/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE20	IOC 31/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE21	IOC 33/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE22	IOC 59/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE23	IOC 65/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE24	IOC 72/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE25	IOC 78/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE26	IOC 81/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE27	IOC 85/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE28	IOC 87/08	Abatedouro/SP	*AN-Suíno	16/04/2008	O:3/4
YE29	IOC 108/08	Industria de Alimentos/SP	AL-Suíno	08/05/2008	O:3/4
YE30	IOC 111/08	Industria de Alimentos/SP	AL-Suíno	08/05/2008	O:3/4
YE31	IOC 001/08	LACEN/PR	HU -Sangue	16/04/2008	O:3/4
YE32	2143	Laboratório Rio de Janeiro/RJ	HU -Sangue	31/05/2005	O:3/4

YE33	IOC 26/07	Abtedouro/SP	AN-Suíno	01/08/2007	5a/1A
YE34	IOC 33/07	Abtedouro/SP	AM-Chão	01/08/2007	5a/1A
YE35	IOC 69/07	Abtedouro/SP	AM-Chão	28/09/2007	5b/1A
YE36	IOC 97/07	Abtedouro/SP	AN-Suíno	28/09/2007	NT/1A
YE37	IOC 118/07	Abtedouro/SP	AM-Chão	28/09/2007	NT/1A
YE38	IOC 120/07	Abtedouro/SP	AM-Parede	28/09/2007	NT/1A
YE39	IOC 125/07	Abtedouro/SP	AM-Mesa	28/09/2007	NT/1A
YE40	IOC 170/08	Abtedouro/SP	AM-Chão	15/05/2008	O:3/4
YE41	IOC 164/07	Abtedouro/SP	AM-Chão	28/09/2007	NT/1A
YE42	IOC 168/07	Abtedouro/SP	AN-Suíno	28/09/2007	NT/1A
YE43	IOC 173/07	Abtedouro/SP	AM-Parede	28/09/2007	NT/1A
YE44	IOC 187/07	Abtedouro/SP	AM-Mesa	28/09/2007	NT/1A
YE45	IOC 274/07	Abtedouro/SP	AM-Mesa	19/10/2007	O:7/1A
YE46	IOC 203/08	LACEN/PR	HU-Fezes	03/09/2008	O:3/4
YE47	IOC 204/08	HOSPITAL /BH	HU	03/09/2008	O:3/4
YE48	IOC 205/08	LACEN/SC	HU-Sangue	15/12/2008	O:3/4
YE49	IOC 001/09	LACEN/PR	HU-Sangue	27/01/2009	O:3/4
YE50	IOC 005/09	LACEN/BA	HU-Fezes	13/07/2009	O:3/4
YE51	IOC 006/09	LACEN/PR	HU-sangue	11/12/2009	O:3/4
YE52	IOC 001/10	FUNED/MG	HU-Swab retal	26/02/2010	O:3/4
YE53	IOC 002/10	FUNED/MG	HU-Swab retal	26/02/2010	O:3/4
YE54	IOC 005/11	Industria de Alimentos/SP	AL-Suíno	23/02/2011	5b/1A
YE55	IOC 009/11	Industria de Alimentos/SP	AL-Suíno	23/02/2011	5b/1A
YE56	IOC 010/11	Industria de Alimentos/SP	AL-Suíno	23/02/2011	5b/1A
YE57	HU 011/11	FUNED/MG	HU-Swab retal	14/09/2011	O:3/4
YE58	HU 012/11	FUNED/MG	HU-Swab retal	26/10/2011	O:3/4
YE59	HU 013/11	LACEN/PR	HU-Hemocomponente	09/11/2011	O:3/4
YE60	HU 014/11	LACEN/PR	HU-Fezes	09/11/2011	O:3/4

Nº - número, SP- São Paulo, PR – Paraná, BH – Belo Horizonte, SC – Santa Catarina, BA – Bahia, MG – Minas Gerais, RJ – Rio de Janeiro, AN – Animal, AM – Ambiente, AL – Alimento, HU – Humano, Hemocomp - hemocomponente e NT - Não tipável * = região tonsilar/língua.

3.2 Caracterização Bioquímica

A caracterização bioquímica para identificação da espécie *Y. enterocolitica* foi realizada segundo Mollaret *et al.*, 1990 e, na confirmação dos isolados escolhidos para a investigação, foram utilizados os seguintes testes: mobilidade a 25-30°C, urease, VP (25°C), ornitina descarboxilase (ODC), indol, Citrato de Simmons, sacarose, xilose, esculina, arginina desidrogenase.

Na classificação em biotipos a amostragem de *Y. enterocolitica* foi analisada segundo os esquemas de Wauters *et al.* (1981) e Mollaret *et al.* (1990), delineadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Biotipificação de *Yersinia enterocolitica* segundo Wauters *et al.*(1981) e Mollaret *et al.* (1990).

Provas	Biotipos							
	1A	1B	2	3	3A	3B	4	5
Salicina	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+/-	-	-	-	-	(+)	-	-
Lipase	+	+	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-	-	-
Pirazinamidase	+	-	-	-	+	+	-	-
VP	+	+	+	+/-	+	+	+	+(+)
ODC	+	+	+	+	-	-	+	+(+)
Sorbose	+	+	+	+	+	-	+	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	V
Sacarose	+	+	+	+	+/-	-	+	+
NO ₃ ⁻ _NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	-
Xilose	+	+	+	+	+	+	-	V
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	-

+: positivo - : negativo (+): tardio (após 72h) V: variável

*Representadas pelas espécies *Y. mollarettii* (sorbose +) e *Y. bercovieri* (sorbose -), diferenciando-se de *Y. enterocolitica* biotipo 3 através de VP- e Mucato +.

3.3 Caracterização Sorológica

A caracterização sorológica foi realizada através da soroaglutinação rápida ou em lâmina (ASENSI & HOFER, 1985). Os antissoros somáticos foram preparados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/Fiocruz, RJ, adotando a técnica descrita por Niléhn (1969) e Wauters *et al.* (1971), utilizando as amostras de referência recebidas do Prof. S. Winblad, Institute of Clinical Bacteriology, Malmö, Sweden.

3.4 Determinação dos fatores fenotípicos de virulência

3.4.1 Ligação ao Cristal Violeta (BHADURI *et al.*, 1987)

A capacidade das cepas de *Y. enterocolitica* de se ligarem ao Cristal Violeta foi testada de acordo com os seguintes procedimentos: as amostras foram crescidas em APA (Água Peptonada Alcalina, pH 8,4 - Difco) por 24 horas em temperatura ambiente (28°C). Após esse período, foi realizada uma diluição na proporção de 10³ células/ml, e alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas de Agar triptosado (Oxoid), incubada em temperatura ambiente (28°C) e a 37° C por 30 horas. As superfícies do meio contendo as colônias foram cuidadosamente submersas com 8 ml de uma solução aquosa de 85µg/ml de Cristal Violeta (Difco) durante dois minutos. As colônias positivas revelando a ligação ou incorporação do Cristal Violeta apresentaram uma tonalidade violeta e aquelas consideradas negativas, permaneceram incolores.

3.4.2 Autoaglutinação (SKURNIK *et al.*, 1984)

As amostras foram semeadas em tubos com 5ml de meio Clark & Lubs (VM/VP - Difco) incubados em temperatura ambiente (28°C) e a 37°C por um período de 24 horas. Durante a leitura dos resultados, as amostras foram

manuseadas de forma cuidadosa, evitando movimentos bruscos, para não haver interferência nos resultados finais. As amostras com autoaglutinação (37°C) revelaram um depósito granular e a superfície líquida de meio relativamente límpida. Por sua vez, as negativas em temperatura ambiente (28°C) apenas turvaram o meio, sem a presença de depósitos granulares.

3.4.3 Comportamento em Ágar Vermelho de Congo - Oxalato de Magnésio (CRMOX - RILEY & TOMA, 1989)

O meio de CRMOX foi preparado com 40g de Ágar Triptose de Soja (Oxoid), que foi dissolvido em 825 ml de água destilada e autoclavado por 15 minutos a 121°C. O meio foi resfriado até uma temperatura de aproximadamente 55°C, e foi adicionado 80 ml de uma solução de oxalato de sódio (Sigma) a 0,25 M, 80ml de uma solução de cloreto de magnésio (Difco) a 0,25 M, 10ml de uma solução de 20% de D - galactose (Sigma) e 5ml de uma solução de 1% de vermelho de Congo (AGFA). A solução de galactose foi esterilizada por filtração e as demais soluções foram autoclavadas por 15 minutos a 121°C. O meio foi misturado e distribuído em placas de Petri descartáveis (15 por 100mm), uma quantidade de 20 ml por placa. As amostras foram semeadas em placas de ágar sangue (5% sangue de carneiro em ágar Columbia sangue base - Difco) incubadas à temperatura ambiente (28°C) por 24h. Esse crescimento de 24h foi passado para o CRMOX, o qual ficou a 37°C por 24h. As amostras CRMOX + apresentam colônias na cor vermelha. Já as CRMOX - estão constituídas de colônias brancas ou incolores (Figura 2). Em uma mesma placa podem ocorrer colônias CRMOX + e CRMOX -, pois nem todas as colônias formadas possuem plasmídeo ou, até mesmo, algumas colônias podem tê-lo perdido.



Figura 2 - Meio CRMOX com colônias positivas (vermelhas) e colônias negativas (brancas).

3.4.4 Atividade da Pirazinamidase (PYZ) (KANDOLO & WAUTERS, 1985)

A atividade da Pirazinamidase foi detectada através do meio preparado com 30g de ágar Triptose de soja (Oxoid), 3g de extrato de levedura (Difco), 2g de ácido pirúvico (Sigma), 1g de pirazinamidase (Sigma) e 1000 ml de água destilada. Foi ajustado o pH para aproximadamente 6,6. Esse meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e distribuído em tubos de rosca de 16 mm x 125 mm, posicionando-os antes da solidificação, levemente inclinados para formar um bisel suave. As amostras foram crescidas em ágar Triptose de soja (Oxoid) inclinado à temperatura ambiente (28°C) por 24h e um inóculo consistente foi semeado na superfície do meio PYZ, mantido à temperatura ambiente (28°C) por 48h. Em sequência, foi adicionado 1 ml da solução aquosa a 1% de sulfato ferroso amoniacal (Merck) sobre o crescimento no meio PYZ e observado o resultado depois de 15 minutos. Os tubos que apresentaram uma tonalidade rósea (clara ou escura) são as PYZ+, detectando a ação da pirazinamidase; já as PYZ- não alteraram sua cor original. É importante salientar que nesse teste as amostras positivas são aquelas que não possuem o plasmídeo, já as negativas são as que possuem ou podem albergar o

plasmídeo. No teste foram utilizadas como controles positivos: *Y. enterocolitica* 5a/1A e *Aeromonas caviae*. E, como controle negativo, foi utilizada *Aeromonas sobria* ATCC 43 979 (CARNAHAL *et al.*, 1989).

3.5 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada utilizando-se a técnica de disco difusão para enterobactérias conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011 (CLSI, 2011).

As amostras foram crescidas em APA (Água Peptonada Alcalina, pH 8,4 - Difco) por 24 horas a 35°C. A seguir foi feita uma diluição desse crescimento na escala de 0.5 de MacFarland em salina estéril. Essa diluição foi semeada em placas de Petri descartáveis (15 por 100 mm) contendo 25ml por placa de Ágar Mueller-Hinton (Oxoid), garantindo uma profundidade de 4 mm de meio. A semeadura da diluição foi feita com swab estéril esfregando-o em toda a superfície do meio. O procedimento é repetido outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez. E por fim passa-se o swab contornando a margem da placa. A tampa da placa fica entreaberta por 3 a 5 minutos para que o excesso de umidade seja dissipado antes da aplicação dos discos impregnados com antibióticos.

Para este teste foram utilizados os discos de antimicrobianos da OXOID, utilizados na rotina do laboratório, com os seguintes antibióticos e concentrações: ampicilina (AMP) 10 µg, cefalotina (KF) 30 µg, cefoxitina (FOX) 30 µg, amicacina (AK) 30 µg, sulfametoxazol (RL) 25 µg, gentamicina (CN) 10 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, cloranfenicol (C) 30 µg, imipenem (IPM) 10 µg, sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) 25 µg, ciprofloxacina (CIP) 5µg e trimetoprim (W) 5 µg.

Como controle para todos os antibióticos foram utilizadas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como controle da amicacina e ciprofloxacina foi utilizado *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CLSI, 2011).

Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar o contato completo do disco com a superfície do ágar. Os discos foram aplicados com um dispensador, que fazia com que fossem distribuídos mantendo uma distância uniforme entre cada disco, em um total de seis discos por placa.

As placas eram invertidas e incubadas na estufa a 35°C por um período de 16 à 18h. Após a incubação, o diâmetro dos halos é medido, incluindo o diâmetro dos discos, em milímetros, com um paquímetro. Com os resultados obtidos, as cepas foram classificadas como: sensíveis, intermediários ou resistentes.

3.6 Detecção dos fatores de virulência pela PCR

3.6.1 Extração do DNA bacteriano

As amostras bacterianas foram cultivadas em caldo triptosado (Oxoid) a 37°C por 18-24 h. Em 2 ml do crescimento se fez a extração do DNA bacteriano através do kit de extração de DNA (DNeasy® Blood & Tissue Kit-Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.

3.6.2 Detecção dos genes de virulência

Foram analisadas a presença dos genes *inv*, *ail*, *ystA* e *virF* através da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com seus respectivos iniciadores (Tabela 4):

Tabela 4 - Primers dos genes de virulência *inv*, *ail*, *virF* e *ystA* e seus respectivos amplicons.

Gene	Nome	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>inv</i>	YC1(F)	CTG TGG GGA GAG TGG GGA AGT TTG G	570	Rasmussen <i>et al.</i> (1994)
	YC2(R)	GAA CTG CTT GAA TCC CTG AAA ACC G		
<i>ail</i>	Ail1 (F)	ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG	170	Nakajima <i>et al.</i> (1992)
	Ail2 (R)	CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG		
<i>ystA</i>	Pr2a (F)	A ATG CTG TCT TCA TTT GGA GCA	145	Ibrahim <i>et al.</i> (1997)
	Pr2c (R)	ATC CCA ATC ACT ACT GAC TTC		
<i>virF</i>	VirF1 (F)	TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG	590	Wren & Tabaqchali (1990)
	VirF2 (F)	ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG		

Para o preparo da mistura da PCR foi utilizado o Kit Platinum® PCR Super Mix (Invitrogen) em um volume final de 50 µL contendo 45 µL da Platinum PCR Super Mix, 2 µL de cada par de iniciador (concentração de 20 pmol) e 1µL de DNA (100ng). Os ciclos de amplificação da PCR foram: um ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese com gel de agarose a 1% preparado em solução TBE (Bio-Rad) 0.5X. O gel foi corado em solução aquosa a 0,1% de brometo de etídeo e visualizado sob a luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular foi utilizado 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies) (Figura 3).

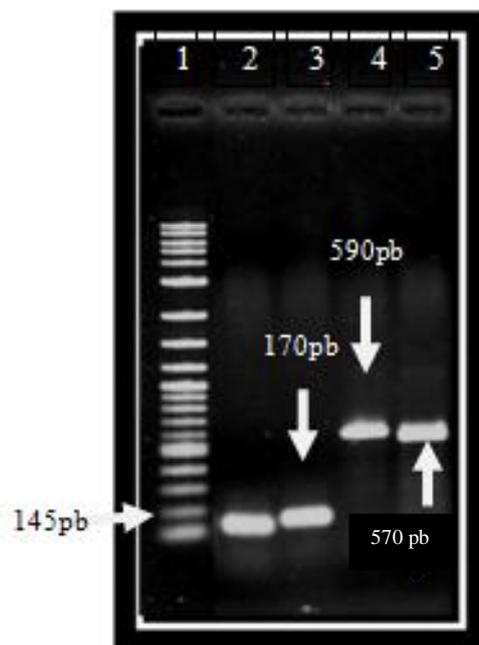


Figura 3 - Gel representativo dos genes de virulência que amplificaram na PCR da cepa YE -04: 1-peso molecular, 2-*ystA*, 3-*ail*, 4-*virF* e 5-*inv*.

3.7 Consenso de repetição intergênica de Enterobactéria (ERIC-PCR)(*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

Para a análise das regiões de repetição intergênicas em enterobactérias foi realizado o ERIC – PCR, utilizando o primer ERIC 2R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'), seguindo a metodologia de Versalovic *et al.* 1991.

O DNA utilizado foi o mesmo extraído para a realização da PCR dos genes de virulência.

Para o preparo da mistura da PCR foi utilizado o *Taq* PCR Kit (BioLabs) em um volume final de 25 μ L por amostra, contendo 13,7 μ L de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q); 5 μ L do tampão PCR 5X; 2,5 μ L de $MgCl_2$; 1,5 μ L de dNTP; 0,3 μ L da *Taq* DNA polimerase; 1 μ L do primer ERIC 2R (concentração de 50 pmoles) e

1µL de DNA (100 ng). Os ciclos de amplificação da PCR foram: um ciclo inicial de 7 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 90°C, de anelamento de 1 minuto a 52°C e extensão de 8 minutos a 65°C, seguido de uma extensão final de 16 minutos a 65°C.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese com gel de agarose (Sigma) a 1,5% preparado em 100 ml de solução TBE (Bio-Rad) 0.5X, com uma corrente de 100v por 1:30h. O gel foi corado em solução aquosa de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular foi utilizado 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies).

A análise dos genótipos foi realizada através do dendrograma confeccionado a partir da análise da foto do gel no programa BioNumerics versão 4. Os padrões de banda foram comparados através do coeficiente de *Dice* recorrendo do método UPGMA (unweighted pair group method with averages) para determinar a similaridade das bandas. Os ERIC genótipos (EGT) foram considerados diferentes se ocorressem quaisquer diferenças nos fragmentos de bandas (FALCÃO *et al.*, 2006).

3.8 Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE*)

Para a avaliação do polimorfismo genético dos isolados foi realizada a técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE), seguindo a metodologia do Pulsenet (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Pulsenet) para *Yersinia pestis*, utilizando os seguintes tampões:

1. Tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA, pH 8,0)
10 ml de Tris (Sigma) a 1M, pH 8,0;
2 ml de EDTA(Sigma) 0,5 M, pH 8,0;
Diluído em 1000 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q).
2. Tampão de Suspensão celular (CSB) (100 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 8,0)
10 ml de Tris (Sigma) a 1M, pH 8,0;
20 ml de EDTA (Sigma) 0,5 M, pH 8,0;
Diluído em 100 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q).
3. Tampão de Lise Celular (CLB) (50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH 8,0 + sarcosil 1%)
25 ml de Tris (Sigma) a 1M, pH 8,0;
50 ml de EDTA(Sigma) 0,5 M, pH 8,0;
50 ml de sarcosil (Sigma) a 10% (N-lauroilsarcosina, sal de sódio);
Diluído em 500 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q).

Para o desenvolvimento da técnica, as amostras foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado (Difco) e incubadas à temperatura ambiente (28°C) por 48 h. Em tubo de vidro de tampa de rosca (12 mm X 75 mm) foram adicionados 2 ml do tampão de suspensão celular (CSB). Um swab estéril foi impregnado com o crescimento bacteriano, e adicionado aos tubos contendo CSB. O espectrofotômetro (Único 1100) foi calibrado para um comprimento de onda de 610 nm de absorbância, assim com a concentração celular para uma densidade óptica de 1.35 (com variação de 1.3-1.4). A suspensão celular foi mantida à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$) durante todo o processo. Em sequência, 400 μL da suspensão foi adicionada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf), acrescentando-se

20µL de uma solução de 20 mg/ml de proteinase K (Invitrogen) e convenientemente misturada.

Para a feitura do plug, foi preparada uma agarose em tampão TE contendo 1% de SeaKem Gold (Cambrex) e 1% de SDS. A agarose foi mantida em banho-maria a 55°C.

Foram incorporados 400 µL da agarose à suspensão celular, misturando de forma rápida para evitar a solidificação do gel, e adicionando-a nos moldes (BioRad) dos plugs. A quantidade utilizada de agarose e suspensão permitiram fazer 2 a 3 plugs, que foram mantidos à temperatura ambiente (28°C) por 10-15 minutos e, posteriormente, colocados por 5 minutos na geladeira (4°C).

Os plugs, foram colocados em um tubo Falcon (TPP) de 50 ml contendo 5 ml do CLB + 25 µL de proteinase K (20mg/ml) para cada amostra, e incubados a 54°C em banho-maria com shaker com uma agitação de 175-200 rpm por 2h.

Antes da etapa das lavagens, foram pré-aquecidos em água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q) e o tampão TE a 50°C. Primeiro realizaram-se as lavagens com água estéril ultra pura, pela adição de 10 ml da água em cada tubo, seguida de incubação a 50°C com uma agitação de 175-200 rpm por 15 minutos. O processo foi repetido duas vezes. Após a lavagem com a água, efetuou-se a lavagem com 5 ml de tampão TE em cada tubo. O tubo foi incubado nas mesmas condições da lavagem com água, só que nesse caso, o processo foi repetido 3 vezes.

Ao fim das etapas de lavagem, o plug poderá ser armazenado em tampão TE, na geladeira (4°C), por um período de até 6 meses.

Como sequência da técnica, efetuou-se a etapa de digestão dos plugs, recorrendo as enzimas de restrição *Not I* (BioLabs) para *Y. enterocolitica* e *Xba I* (BioLabs) para *Salmonella* ser. Braenderup H9812, referência como padrão de peso molecular.

Os plugs foram cortados ao meio (2.0-2.5 mm de área) e colocados em tudo de microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf) contendo a enzima e seus reagentes de acordo com os modelos apresentados na Tabela 5:

Tabela 5 - Enzimas de restrição *Not I* e *Xba I* e seus reagentes.

<i>Not I</i>		<i>Xba I</i>	
Reagentes	Quantidade	Reagentes	Quantidade
Água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q)	177 µL	Água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q)	175,5 µL
BSA 1% (BioLabs)	2 µL	BSA 1% (BioLabs)	2 µL
Tampão 3 (BioLabs)	20 µL	Tampão 4 (BioLabs)	20 µL
<i>Not I</i> (10U/µL)(BioLabs)	1 µL	<i>Xba I</i> (20U/µL)(BioLabs)	2,5 µL
Total	200 µL	Total	200 µL

Os tubos com seus constituintes foram incubados em banho-maria a 37°C, sendo aqueles contendo as amostras de *Y. enterocolitica* sofreram a incubação por um período de 4h, enquanto os da *Salmonella* ser. Braenderup foram mantidos por 2h.

Após o período de digestão foi retirada a enzima de restrição e adicionado o tampão TE, mantendo na geladeira (4°C) por 5 minutos. Tal procedimento visou inativar a enzima de restrição.

O gel para corrida foi preparado com 100 ml de TBE (Norgen Biotekcorp.) a 0,5X e a agarose SeaKem Gold (Cambrex) a 1%. Para a corrida recorreu-se ao tampão TBE a 0,5X.

O Sistema de eletroforese utilizado foi o CHEF-DR III[®] (Bio-Had) com as seguintes condições de corrida: pulso inicial 1,79s, pulso final 18,66s, voltagem 200v, temperatura 14°C e o tempo de corrida de 20h. O gel foi corado em solução aquosa de 1% de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

A análise dos genótipos foi realizada através do dendrograma confeccionado a partir da foto do gel no programa BioNumerics versão 4. Os padrões de banda foram comparados, da mesma forma que o ERIC-PCR, através do coeficiente de

Dice usando o método UPGMA (unweighted pair group method with averages) para determinar a similaridade das bandas e o critério instituído por Tenover et al. (1995) para definir os tipos de clusters do PFGE. Estabeleceu-se um cut off $\geq 85\%$ formando grupos geneticamente relacionados, e os isolados com os padrões de banda com 100% de similaridade foram enquadrados como sendo representantes do mesmo tipo de pulso do PFGE (PPT) (JOHNSON *et al.*, 2007).

3.9 Cálculo do índice de diversidade das técnicas moleculares de tipagem

Para se avaliar a capacidade discriminatória tanto do ERIC-PCR quanto do PFGE, recorreu-se ao cálculo do índice de diversidade de Simpson (Simpson's Index of Diversity - HUNTER & GASTON, 1988), através da seguinte fórmula (Figura 4):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Figura 4 - Fórmula do índice de diversidade de Simpson.

Onde N é o número total de amostras da população de estudo, s é o número total de tipos encontrados e n_j é o número de amostras dentro de cada tipo. O índice numérico de discriminação D tem como base a probabilidade de duas amostras não relacionadas serem agrupadas dentro da população em estudo em diferentes grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Testes Fenotípicos, Testes de susceptibilidade a antimicrobianos e PCR dos genes de virulência.

Os dados obtidos nos testes fenotípicos, no comportamento da susceptibilidade antimicrobiana (TSA) e de PCR dos genes de virulência foram reunidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do antibiograma (TSA), PCR dos genes de virulência e testes fenotípicos das 60 amostras de *Y. enterocolitica* analisadas.

Amostra	Fonte	Data	Origem	TSA (resistência)	Genes de Virulência	Testes Fenotípicos	Sorovar/Biotipo
YE1	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL, TE, SXT		CV	O:3/4
YE2	Animal	2007	SP	AMP, KF		CV	O:3/4
YE3	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL, TE			O:3/4
YE4	Animal	2007	SP	AMP, KF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE5	Animal	2007	SP	AMP, KF, SXT, W			O:3/4
YE6	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL			O:3/4
YE7	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL			O:3/4
YE8	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL			O:3/4
YE9	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL, TE		CRMOX,	O:3/4
YE10	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL,			O:3/4
YE11	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL,			O:3/4
YE12	Animal	2007	SP	AMP, KF, AK, RL,			O:3/4
YE13	Animal	2007	SP	AMP, KF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE14	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL,	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE15	Animal	2007	SP	AMP, KF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE16	Animal	2008	SP	AMP, KF		CRMOX	O:3/4
YE17	Animal	2008	SP	AMP, KF, TE, SXT			O:3/4
YE18	Animal	2008	SP	AMP, KF		CRMOX	O:3/4
YE19	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL		CRMOX	O:3/4
YE20	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL, TE		CRMOX	O:3/4
YE21	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE22	Animal	2008	SP	AMP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE23	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE24	Animal	2008	SP	AMP, KF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE25	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL			O:3/4
YE26	Animal	2008	SP	AMP, RL	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE27	Animal	2008	SP	AMP, KF		CRMOX	O:3/4
YE28	Animal	2008	SP	AMP, KF, RL		CRMOX	O:3/4
YE29	Alimento	2008	SP	AMP, KF, RL, SXT, W		CRMOX	O:3/4

YE30	Alimento	2008	SP	AMP, KF, RL, SXT, W				O:3/4
YE31	Humana	2008	PR	AMP, KF, RL				O:3/4
YE32	Humana	2005	RJ	AMP, KF, RL				O:3/4
YE33	Animal	2007	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		5a/1A
YE34	Ambiente	2007	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		5a/1A
YE35	Ambiente	2007	SP	AMP, KF	<i>inv</i>	PYZ		5b/1A
YE36	Animal	2007	SP	AMP, KF, RL		PYZ		NT/1A
YE37	Ambiente	2007	SP	AMP, KF, RL		PYZ		NT/1A
YE38	Ambiente	2007	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		NT/1A
YE39	Ambiente	2007	SP	AMP, KF		PYZ		NT/1A
YE40	Ambiente	2008	SP	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE41	Ambiente	2007	SP	AMP, KF,RL		PYZ		NT/1A
YE42	Animal	2007	SP	AMP, KF,FOX, RL, TE		PYZ		NT/1A
YE43	Ambiente	2007	SP	AMP, KF		PYZ		NT/1A
YE44	Ambiente	2007	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		NT/1A
YE45	Ambiente	2007	SP	AMP, KF	<i>inv</i>	PYZ		O:7/1A
YE46	Humana	2008	PR	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE47	Humana	2008	MG	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE48	Humana	2008	SC	AMP, KF, RL, SXT, W	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE49	Humana	2009	PR	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>	Autog, CV		O:3/4
YE50	Humana	2009	BA	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE51	Humana	2009	PR	AMP, KF,RL, TE	<i>inv, ail, ystA</i>	CV		O:3/4
YE52	Humana	2010	MG	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE53	Humana	2010	MG	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE54	Alimento	2011	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		5b/1A
YE55	Alimento	2011	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		5b/1A
YE56	Alimento	2011	SP	AMP, KF, FOX, RL	<i>inv</i>	PYZ		5b/1A
YE57	Humana	2011	MG	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX		O:3/4
YE58	Humana	2011	MG	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX		O:3/4
YE59	Humana	2011	PR	AMP, KF,RL, W	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4
YE60	Humana	2011	PR	AMP, KF,RL	<i>inv, ail, ystA</i>			O:3/4

AMP = ampicilina, KF = cefalotina, AK = amicacina, FOX = cefoxitina, RL = sulfametoxazol, TE = tetraciclina, SXT = sulfametoxazol-trimetoprim, W = trimetoprim, Autoag = autoaglutinação, CV = ligação ao cristal violeta, CRMOX = comportamento em Ágar Vermelho de Congo - Oxalato de Magnésio e PYZ = atividade da Pirazinamidase a 37°C.

O teste da autoaglutinação apresentou 12 (20%) amostras positivas e 48 negativas a 37°C. Já em temperatura ambiente, todas foram negativas. No teste de ligação ao Cristal Violeta foram constatadas 15 (25%) amostras positivas e 45 negativas a 37°C. Em temperatura ambiente, todas foram negativas. No meio CRMOX, foram detectadas 19 amostras positivas e 41 negativas a 37°C. Em temperatura ambiente, apenas uma amostra positiva foi encontrada. Quanto ao teste PYZ, revelou 15 (25%) amostras positivas e 35 negativas.

Os resultados dos testes fenotípicos de acordo com os sorotipos e biótipos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultado dos testes fenotípicos de acordo com o sorotipo/biotipo das 60 amostras.

Testes Fenotípicos	Sorotipos/Biotipos				
	O:3/4 n(%)	5a/1A n(%)	5b/1A n(%)	O:7/1A n(%)	NT/1A n(%)
Autoaglutinação	12(27)	-	-	-	-
Cristal Violeta	15(33)	-	-	-	-
CRMOX	19(42)	-	-	-	-
PYZ	-	2 (100)	4(100)	1(100)	8(100)
Total	45	2	4	1	8

As amostras de resultado positivo para os 3 testes fenotípicos (autoaglutinação, cristal violeta e CRMOX) para a presença do plasmídeo e negativo para o PYZ foram: YE4,13,14,15, 21, 22, 23,24, 26, 57 e 58, todas O:3 biotipo 4 (Tabela 6).

Já para a pesquisa dos genes de virulência *inv*, *ail*, *virF* e *ystA*, recorreu-se à técnica da PCR, tomando como referência as 11 amostras que se revelaram positivas nos testes fenotípicos específicos. Visando uma análise de controle dos ensaios, foram também incluídas nessa abordagem todas as cepas que não evidenciaram positividade no processo fenotípico.

A frequência com que esses genes de virulência foram encontrados nesta amostragem está representada na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequência dos genes de virulência nas 60 amostras

Genes de virulência	Nº amostras	Porcentagem
<i>inv</i>	31	52
<i>ail</i>	22	37
<i>ystA</i>	22	37
<i>virF</i>	11	18

A análise da frequência do gene de virulência de acordo com sorotipo/biotipo encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequência dos genes de virulência por sorotipos/biotipos das 60 amostras.

Genes de virulência	Sorotipos/Biotipos				
	O:3/4 n(%)	5a/1A n(%)	5b/1A n(%)	O:7/1A n(%)	NT/1A n(%)
<i>inv</i>	22(49)	2(100)	4(100)	1(100)	2(25)
<i>ail</i>	22(49)	-	-	-	-
<i>ystA</i>	22(49)	-	-	-	-
<i>virF</i>	11(24)	-	-	-	-
Total	45	2	4	1	8

Já os resultados da frequência dos genes de virulência quanto à origem se encontram na Tabela 10.

Tabela 10 - Frequência dos genes de virulência por fonte de isolamento das 60 amostras.

Genes de virulência	Fonte			
	Animal n(%)	Humana n(%)	Ambiente n(%)	Alimento n(%)
<i>inv</i>	10(32)	12(85)	6(60)	3(60)
<i>ail</i>	9(29)	12(85)	1(10)	-
<i>ystA</i>	9(29)	12(85)	1(10)	-
<i>virF</i>	9(29)	2(14)	-	-
Total	31	14	10	5

Em todas as 11 amostras fenotipicamente positivas de *Y. enterocolitica* foram detectados os genes de virulência, incluindo o gene plasmidial *virF*. Esse gene confirma a presença do plasmídeo nas amostras analisadas.

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos revelou a alta resistência da *Y. enterocolitica* à ampicilina (100%) e à cefalotina (97%). A Tabela 11 nos revela o perfil de resistência das amostras estudadas. Ainda cinco amostras apresentaram resistência a 5 antibióticos, a sendo amostra YE42 (perfil: AMP, KF, FOX, RL, TE) resistente a 3 classes de antibióticos diferentes (cefalosporina, sulfonamida e tetraciclina), com exceção da ampicilina e cefalotina.

Tabela 11 - Percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos nas 60 amostras

Antimicrobiano	Resistente n(%)	Sensível n(%)
Amicacina (AK)	1(2)	59(98)
Ampicilina (AMP)	60(100)	-
Cefalotina (KF)	58(97)	2(3)
Cefoxitina (FOX)	8(13)	52(87)
Ciprofloxacina (CIP)	-	60(100)
Cloranfenicol (C)	-	60(100)
Gentamicina (CN)	-	60(100)
Imipenem (IPM)	-	60(100)
Sulfametoxazol (RL)	41(68)	19(32)
Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT)	6(10)	54(90)
Tetraciclina (TE)	7(12)	53(88)
Trimetoprim (W)	5(8)	55(92)

4.2 ERIC-PCR

As 60 amostras foram submetidas ao ensaio do ERIC-PCR gerando perfis para análise de possíveis similaridades genéticas dentro dessas regiões repetitivas no DNA de enterobactérias. A análise dos géis possibilitou a construção de um dendrograma que revelou a existência de 32 ERIC genótipos (EGT) representados na Figura 5.

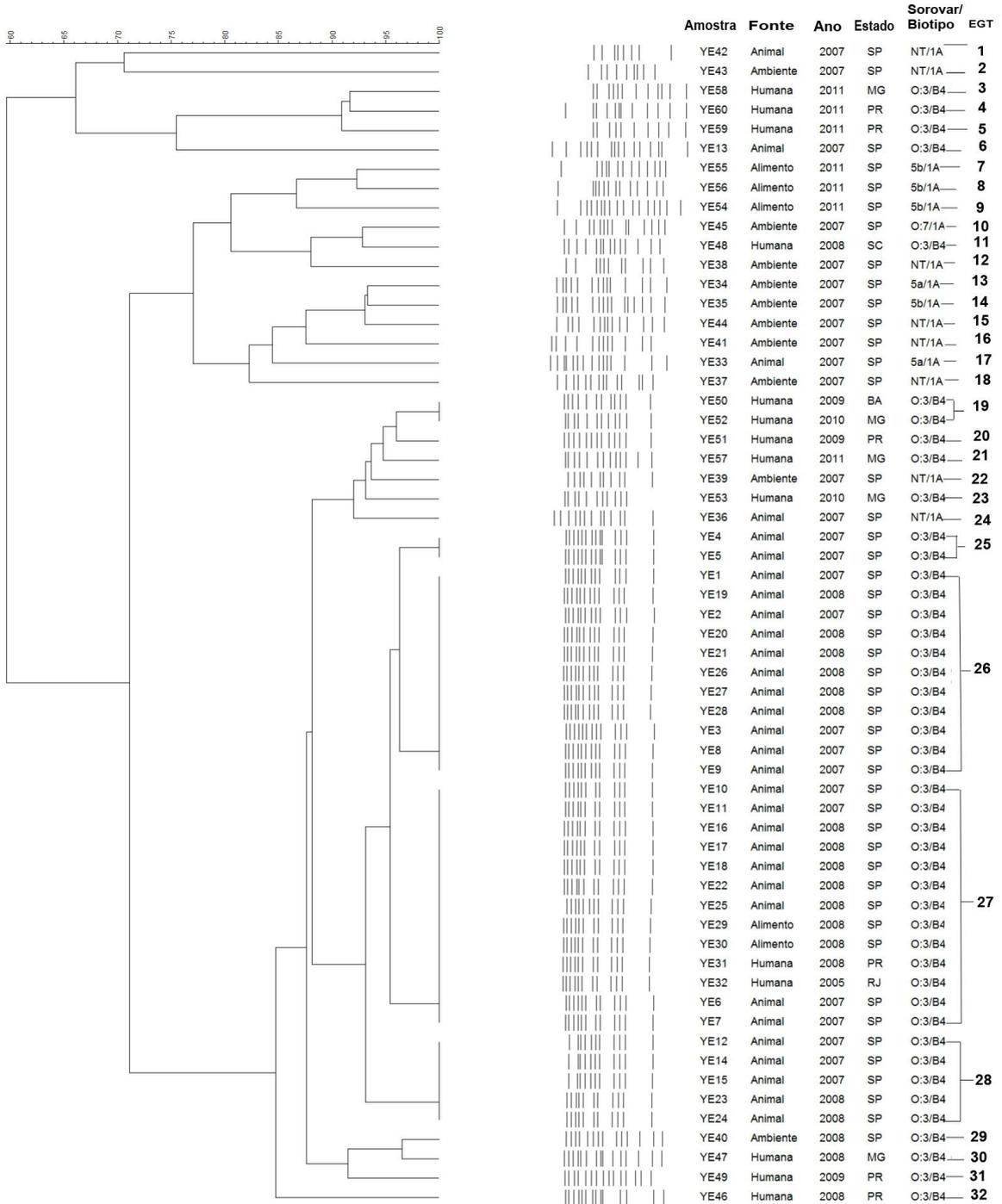


Figura 5 - Dendrograma gerado a partir dos genótipos (EGTs) das 60 amostras obtidas pelo ERIC-PCR.

4.3 PFGE

As 60 amostras também foram submetidas ao ensaio do PFGE para análise do polimorfismo genético entre os isolados. E mais uma vez, como no ERIC-PCR, a análise do gel nos forneceu elementos para a montagem de um dendrograma, constituído de nove clusters (A até I), agrupando os isolados com $\geq 85\%$ de similaridade. Dentro dos clusters, 36 isolados apresentaram padrões únicos de banda (PPT) com 100% de similaridade de acordo com a disposição retratada na Figura 6. A análise desses padrões revelou o grande poder discriminatório do PFGE, agrupando as amostras do sorovar O:3 Biotipo 4 de origens animal e humana no cluster A. As amostras pertencentes ao Biotipo 1A de origens ambiental, alimentar e animal, ficaram distribuídas pelos outros 7 clusters (B a I). Os clusters B e C evidenciaram uma similaridade de 83%, enquanto os clusters de B até H demonstraram uma similaridade de 80%. Salienta-se que o cluster I, o mais afastado filogeneticamente, revelou uma similaridade de 65% frente aos outros clusters.

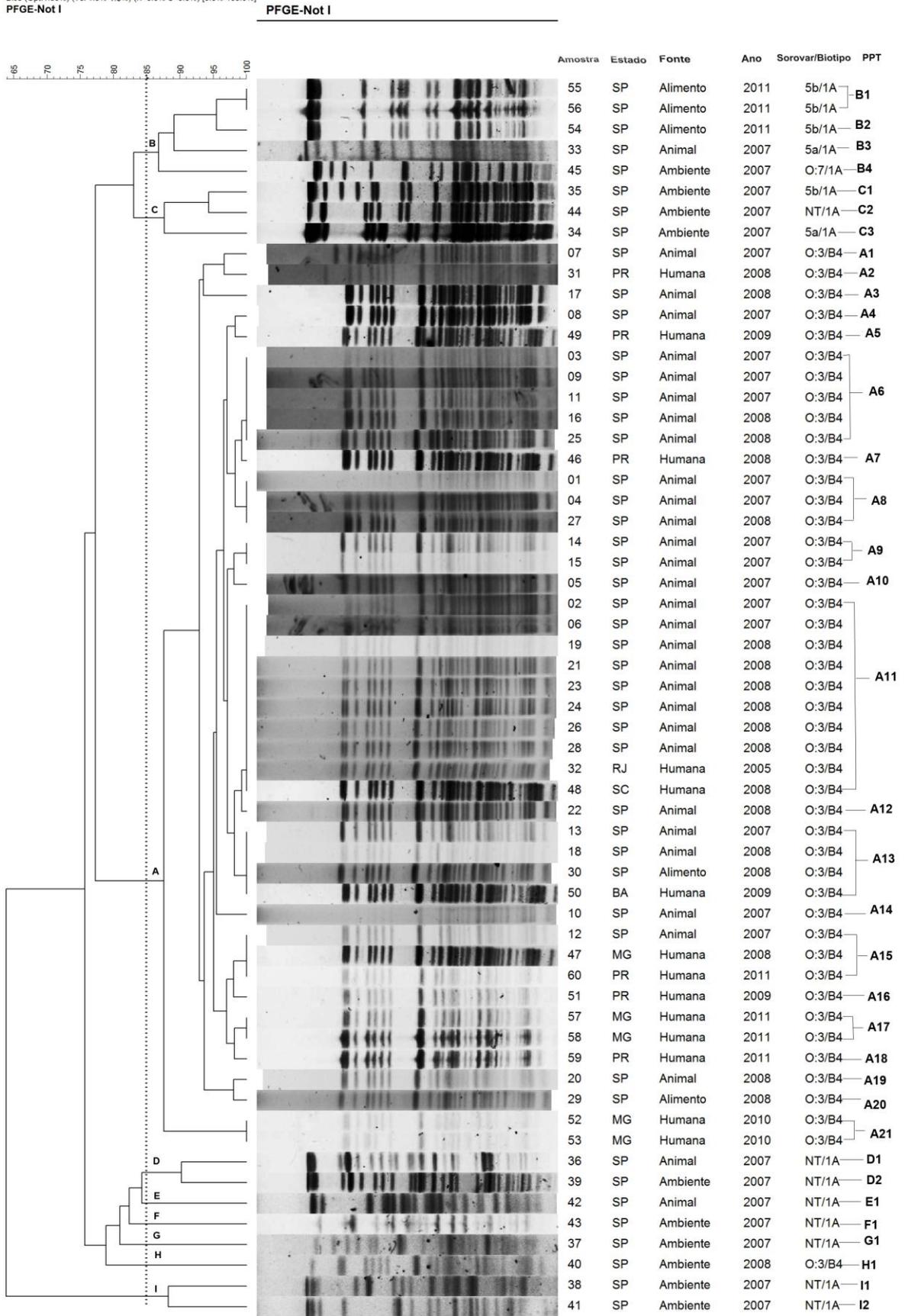


Figura 6 - Dendrograma construído a partir da análise das bandas, gerando clusters com similaridade de $\geq 85\%$ das 60 amostras obtidos pelo PFGE.

5 DISCUSSÃO

Os testes fenotípicos para detectar a presença de plasmídeos apresentaram resultados positivos quando as amostras de *Y. enterocolitica* O:3 foram incubadas a 37°C (Tabela 6). Isto se deve a própria característica plasmidial, relacionada a esta temperatura (GEMSKI *et al.*, 1980). Alguns testes, como a Ligação do Cristal Violeta e o PYZ, não apenas indicam a possível presença do plasmídeo, como também a capacidade da bactéria em adquiri-lo. Em contraposição, nos cultivos em temperatura ambiente (28°C), os testes fenotípicos se comportaram como negativos, uma vez que o plasmídeo é instável ou pode ser perdido em temperaturas abaixo de 30°C. Além disso, os sucessivos repiques “in vitro” ocasionam alterações de comportamento do plasmídeo (ZHENG *et al.*, 2008), razão pela qual algumas amostras apresentaram resultados positivos e negativos dependendo da sensibilidade dos testes fenotípicos.

Os resultados obtidos confirmam as observações realizadas por vários autores, inclusive no Brasil (FALCÃO *et al.*, 2006; PAIXÃO *et al.*, 2012), que demonstraram a correlação do biotipo e sorotipo (O:3 biotipo 4) com o perfil fenotípico indicativo de sua potencialidade patogênica para os hospedeiros suscetíveis (FARMER *et al.*, 1992; BAUAB *et al.*, 1995).

A amplificação do gene plasmidial *virF* foi positiva em todas as cepas positivas para todos os testes fenotípicos, com exceção do PYZ.

Além da presença do pYV, as 11 cepas de *Y. enterocolitica* O:3 patogênicas também possuem fatores de patogenicidade codificados por genes cromossômicos (LEAL *et al.*, 1997), responsáveis pela adesão e invasão de células epiteliais. Trata-se de um segmento do DNA cromossômico chamado de *ail* (MILLER *et al.*, 1990), que codifica uma proteína de membrana externa (Ail), conferindo a capacidade de

resistir à ação bactericida do complemento a 37°C (BLISKA & FALKOW, 1992). O sorotipo O:3 também é capaz de produzir uma enterotoxina termoestável, responsável pelo quadro de diarreia, relacionada à região cromossomial conhecida como *ystA* (REVELL & MILLER, 2001). Tais cepas são ainda produtoras de uma invasina, que atua na invasão celular, codificada pela região do cromossomo reconhecida como *inv* (RASMUSSEN *et al.*, 1994).

A presença de todos os fatores de virulência em 25% (11 cepas) (Tabela 9) das amostras isoladas de suínos e humanos é teoricamente pequena, se comparado com os valores encontrados em trabalhos do Brasil como em Falcão *et al.* (2006), que demonstraram uma taxa de 100% para os genes *ail*, *ystA* e *inv*, e 94,6% para o *virF* de isolados de suínos e humanos doentes, e em trabalhos internacionais como em Zheng *et al.* (2008) que demonstrou uma taxa de 100% para o *inv*, 94% para o *ail*, 93% para o *ystA* e 82% para o *virF* em pacientes com diarreia. Mas, mesmo em uma taxa baixa, ainda é uma quantidade considerável, por se tratar de um importante patógeno relacionado a infecções zoonóticas (CARNIEL & MOLLARET, 1990).

Dez amostras de origem humana apresentaram somente os genes cromossomiais *ail*, *ystA* e *inv* e não o plasmidial *virF* (Tabela 4). Uma das hipóteses para tal fato pode ter sido a perda do plasmídeo que é instável a temperaturas abaixo de 30°C, como citado anteriormente (ZHENG *et al.*, 2008). É interessante a ausência dos fatores de virulência em duas cepas de origem humana, tendo em vista que a expectativa era evidenciar algum fator de virulência nessas amostras (FALCÃO *et al.*, 2006). No entanto, as informações clínico-epidemiológicas dos pacientes dos isolados não indicavam a figura de doentes, provavelmente portadores hígidos. Não se pode também afastar a possibilidade da ocorrência de outros fatores de virulência que não foram investigados no projeto, pois a

patogenicidade em *Yersinia* é um processo complexo que envolve uma multiplicidade de genes, tanto no cromossomo, como no plasmídeo de virulência (REVELL & MILLER, 2001).

Os genes de virulência cromossomiais podem ser perdidos, da mesma forma que ocorre com o plasmídeo, dependendo das condições dos métodos de cultivo. Entretanto, a perda do plasmídeo em *Y. enterocolitica* é um evento muito comum, enquanto que esse acontecimento com gene de virulência cromossomial foi raramente reportado. Caso tal afirmativa seja válida, provavelmente a ocorrência estará ligada a vários fatores, incluindo em particular ao meio de cultura e a temperatura da incubação. Será fundamental que novas pesquisas sejam efetuadas na tentativa de identificar a perda total ou parcial de alguns marcadores cromossômicos tradicionais, conforme Zheng e seus colaboradores propuseram em 2008.

Nove amostras pertencentes ao biotipo 1A, tanto de alimentos como do ambiente e uma de origem animal (Tabela 9), demonstraram a presença do gene *inv* (Tabela 10). As amostras pertencentes a esse biótipo há algum tempo eram tidas como comensais do ambiente, não patogênicas. A presença desse gene nessas amostras está de acordo com que é encontrado no Brasil (FALCÃO & FALCÃO, 2006; CAMPIONI, 2009) e no mundo (KRAUSHAAR *et al.*, 2011), admitindo-se que os representantes desse biotipo talvez não sejam tão inofensivos.

No que tange à resistência aos antibióticos é interessante notar a resistência intrínseca que *Y. enterocolitica* possui frente à ampicilina e à cefalotina (Tabela 11). Essa resistência provavelmente se deve à presença dos genes cromossomiais *blaA* e *blaB* responsáveis pela produção de duas β -lactamases: A e B (BONKE *et al.*, 2011). Cinco amostras apresentaram resistência a cinco antibióticos (Tabela 6), já a amostra YE42 (perfil: AMP, KF, FOX, RL, TE) apresentou resistência a 3 classes de

antibióticos diferentes (cefalosporina, sulfonamida e tetraciclina), com exceção da ampicilina e cefalotina. No entanto, a resistência não demonstrou nenhuma correlação com a fonte de isolamento ou biotipo. É um dado interessante, uma vez que as amostras de *Y. enterocolitica* que revelaram maior resistência apresentaram-na a seis antibióticos, de acordo com Baumgartner *et al.* (2007).

Ressalta-se ainda que algumas cepas evidenciaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e à tetraciclina, que são dois antibióticos utilizados na terapêutica de yersiniose (BONKE *et al.*, 2011; FÀBREGA & VILA, 2012).

Uma cepa apresentou resistência à amicacina, que é um aminoglicosídeo, utilizado em associação a outros antibióticos, no tratamento de yersiniose extra-intestinal, incluindo septicemia (BOTTONNE, 1997; FÀBREGA & VILA, 2012). Por sinal, tal resistência foi observada em cepas isoladas de animais no Brasil (FALCÃO *et al.*, 2006).

Por outro lado, registra-se na presente investigação a baixa resistência aos antimicrobianos nos isolados que apresentaram todos os fatores de virulência, sendo que as amostras YE22 e 26 (Tabela 6) curiosamente não apresentaram resistência nem à cefalotina. É notório que o plasmídeo pYV não possui nenhum papel em termos de participação no perfil de resistência antimicrobiana, fato registrado na literatura por Bhaduri *et al.* (2009) e Fredriksson-Ahomaa *et al.* (2010).

A análise das regiões repetitivas intergênicas em enterobactérias, através do ERIC-PCR, revelou a existência de 32 EGTs com uma similaridade mínima de 60% entre todos os isolados (Figura 5), gerando um índice discriminatório de 0,924. Este índice discriminatório de diversidade (Simpson's Index of Diversity - HUNTER & GASTON, 1988), encontra-se em um valor aproximado do que é encontrado na literatura neste tipo de análise (SACHDEVA & VIRDI, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006).

Quarenta amostras pertencentes ao sorovar O:3 biotipo 4 de origens humana, animal, alimentar e ambiental ficaram agrupadas dentro de 12 EGTs em um grupo com uma similaridade de 85%. Representantes desse sorovar e biotipo isolados de animal, principalmente de suíno e do homem, costumam apresentar uma grande similaridade genotípica (WOJCIECH *et al.*, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006).

Nesse grupo reconhecemos três EGTs; os EGTs 26, 27 e 28; constituídos de 11, 13 e 5 amostras, respectivamente. Em cada um dos EGTs anteriormente citados, as amostras têm 100% de similaridade, ou seja, são consideradas clones (TENOVER *et al.*, 1995). Entre os EGTs 26 e 27 existe uma similaridade de 96% e quando associados ao EGT 28, resulta uma similaridade de 94%.

A similaridade de cada EGT e entre esses EGTs é passível de explicação, tendo em vista a origem desses grupos, pois foram isolados de suínos de dois abatedouros na região de Campinas. Observando-se o período das coletas, nos anos 2007 a 2008, conclui-se que estas bactérias, de alguma forma, conseguiram se manter nos animais, provavelmente como portadores crônicos.

Dentro do EGT 27 ainda estão agrupadas duas amostras de origem humana, do Paraná e do Rio de Janeiro, de 2008 e 2005, respectivamente. Tal resultado suscita a ideia de que este fenótipo/genótipo prevalece em nosso meio, circulando pelas fontes de infecção, particularmente no elo zoonótico representado por suíno-homem, por um tempo maior que o imaginado.

Já as amostras do Biotipo 1A isoladas de alimentos e ambiente são extremamente heterogêneas sorologicamente e apresentaram padrões de banda mais diversificados, como é encontrado na literatura (SACHDEVA & VIRDI, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010).

Quando se analisa, no dendrograma gerado pelo ERIC-PCR, as amostras que possuem todos os fatores de virulência, não é possível fazer uma correlação,

uma vez que se encontram dispersas por vários EGTs. Logo, a presença dos genes de virulência parece não influenciar nos perfis gerados pelo ERIC-PCR (FALCÃO *et al.*, 2006).

Respaldo nos resultados do ERIC-PCR, sugere-se que o suíno se constitui em uma importante fonte de infecção e de transmissão ao homem no ciclo epidemiológico de *Y. enterocolitica* O:3, inclusive no Brasil, corroborando com as investigações realizadas em diferentes partes do mundo (BOTTONE, 1999; WOJCIECH *et al.*, 2004; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-a).

A análise do polimorfismo genético das amostras, através do PFGE, nos revelou a existência de nove clusters (A até I) agrupando os isolados com $\geq 85\%$ de similaridade (Figura 6). Nestes clusters, foram agrupados trinta e seis padrões únicos de banda, gerando um índice discriminatório de diversidade (Simpson's Index of Diversity - HUNTER & GASTON, 1988) de 0,957, da mesma forma como calculado para o ERIC-PCR. Salienta-se que esse índice, à semelhança daquele firmado no ERIC-PCR, coaduna-se com os valores citados por diferentes autores, retratando várias regiões do mundo (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2001; FALCÃO *et al.*, 2006; SIHVONEN *et al.*, 2011).

O cluster A englobou 21 PPTs (A1 a A21), sendo todas as amostras do sorovar O:3 biotipo 4 isoladas de animal e de casos humanos. Mais uma vez, enfatiza-se que a alta similaridade entre os perfis de bandas dos isolados se compatibiliza com os resultados apontados na literatura, que destacaram a importância do suíno na cadeia epidemiológica da yersiniose humana provocada pelo sorotipo O3 biotipo 4 (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-a). Ainda no cluster A, encontram-se alguns PPTs que agrupam mais de um isolado, como o A11, que agrupa 10 cepas com 100% de

similaridade. Neste caso, segundo Tenover e colaboradores (1995), essas amostras são indistinguíveis geneticamente, pela qual são chamadas de clones. Pela similaridade (ERIC-PCR) entre os isolados de suínos, admite-se que as influências da origem circunscrita a uma mesma região e dos períodos muito próximos da análise, caracterizaram a situação epidemiológica como um verdadeiro nicho. É interessante citar que A11 englobou duas amostras humanas, uma de Santa Catarina e outra do Rio de Janeiro isoladas em 2008 e 2005 respectivamente. Com base neste resultado e naquele referido no ERIC-PCR, suscita a hipótese que o pulsotipo circula no Brasil mesmo em regiões geograficamente distintas, mas que são polos de suinocultura em nosso meio. Os outros PPTs encontrados com mais frequência dentro deste cluster foram os PPTS A6, A8, A9, A13, A15, A17 e A21 com respectivamente 5, 3, 2, 4, 3, 2 e 2 amostras. Os PPTs A13 e A15 também agrupam isolados de humanos e animais, caindo no mesmo caso do A11.

Duas hipóteses podem ser aventadas para tentar explicar a alta similaridade de 87% dentro do cluster A. A primeira é que essas amostras podem ser relacionadas, e a diferença pode ser devida a alguns eventos genéticos, como deleção ou inserção de DNA ou perda ou ganho de áreas de restrição (TENOVER *et al.*, 1995). Assume-se também que bactérias não relacionadas epidemiologicamente devem possuir genótipos diferentes. Já as envolvidas em um surto e/ou epidemia devem apresentar padrões de banda indistinguíveis (TENOVER *et al.*, 1995; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Quanto à segunda hipótese, ela pode ser devida à grande similaridade encontrada entre isolados de origem humana e suína. Estudos realizados na Finlândia e na Alemanha demonstraram que os isolados de origem humana eram quase indistinguíveis dos isolados de origem suína nestas regiões (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-a). Tal fato não foi

detectado quando comparados os isolados dos países, provavelmente em decorrência da distância e da ausência de um intercâmbio entre as duas regiões consideradas (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-a).

Em relação ao Brasil, salienta-se que os produtos da suinocultura, carnes, embutidos, etc., geralmente são comercializados para inúmeras localidades, distantes ou não geograficamente, favorecendo a circulação de *Y. enterocolitica* O:3 B4, com alta similaridade fenotípica e genotípica, por várias regiões.

As amostras isoladas de alimentos e ambiente pertencentes ao Biotipo 1A, demonstraram ter uma maior diversidade entre suas bandas quando comparadas aos isolados de animal e humana do Biotipo 4 (Figura 6).

A maior diversidade pode estar relacionada, como no caso do ERIC-PCR, à diversidade de sorotipo dos representantes desse biotipo, sendo que algumas dessas cepas não puderam nem ser tipadas sorologicamente (SACHDEVA & VIRDI, 2004; FALCÃO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010) .

As amostras do Biotipo 1A foram agrupadas em 8 clusters (B a I) e ao comparar o cluster B com o C foi evidenciada uma similaridade de 83%. No cluster B as amostras ficaram bem agrupadas em relação à fonte de isolamento como, por exemplo, as de alimentos de 2011 provenientes de São Paulo que apresentaram uma similaridade de 95%. A presença de uma amostra isolada de animal (5a/1A - PPT B3) dentro do cluster B nos leva a crer que se trata de uma contaminação do ambiente e que essa amostra não teve origem em um processo infeccioso, apesar de ela possuir o gene *inv* de virulência.

No cluster C, ficaram agrupadas com 87% de similaridade 3 amostras ambientais provenientes da mesma região de São Paulo e do mesmo ano; logo, são consideradas geneticamente relacionadas e provavelmente se originaram de um ancestral comum (TENOVER *et al.*, 1995).

Note-se que nos clusters de D até I ficaram agrupadas as cepas não tipáveis antigenicamente de origem ambiental e animal. Aquelas de origem animal provavelmente se enquadram como citado para o cluster B e talvez resultem de uma contaminação do ambiente.

Quando se analisa, no dendrograma gerado pelo PFGE, as cepas que possuem todos os fatores de virulência, observa-se que algumas das amostras foram agrupadas nos mesmos PPTs, como no A9, reunindo as YE14 e 15, no A11, que agrupa as cepas YE 21, 23, 24 e 26 e no A17, que engloba as amostras YE57 e 58. Com base em tais resultados, teoriza-se que o PFGE possa ser capaz de agrupar cepas portadoras dos genes de virulência. No entanto, mais estudos devem ser realizados e aprofundados, uma vez que as amostras agrupam-se dentro dos mesmos pulsotipos devido a suas origens, ano e fonte de isolamento ou devido ao seu sorovar/biotipo.

Nenhuma correlação direta pode ser estabelecida entre os PPTs de *Y. enterocolitica* e os padrões de resistência aos antimicrobianos, aspecto descrito na literatura (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2010).

Ao comparar os resultados obtidos pelo ERIC-PCR com aqueles do PFGE, verifica-se que realmente o PFGE possui um maior poder de discriminação, apoiado pelo seu maior índice discriminatório de 0,957 contra 0,924 do ERIC-PCR (FALCÃO *et al.*, 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-a; SOUZA *et al.*, 2010). O PFGE demonstrou ser a ferramenta mais apropriada para estudos epidemiológicos de *Y. enterocolitica*, pois permite a subtipagem de cepas pertencentes ao mesmo Biosorotipo (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b).

No entanto, os resultados do ERIC-PCR foram altamente satisfatórios, uma vez que foi possível reunir as amostras por sorovar/Biotipo, e fonte de isolamento de forma bem similar aos resultados encontrados no PFGE. Logo, o ERIC-PCR

demonstrou ser uma técnica capaz de tipar amostras, porém com um menor poder de discriminação, de acordo com Sachdeva & Viridi (2004) e Falcão *et al.* (2006).

Consoante os resultados obtidos é possível concluir que, na incapacidade de realização do PFGE, por ser uma técnica que necessita de reagentes e aparelhagem de alto custo, além do tempo necessário para a completa análise dos dados que demanda de 2 a 3 dias, o ERIC-PCR é uma alternativa, pois apesar do seu menor poder de discriminação, tem um menor custo e demanda um tempo menor na análise completa dos dados (FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2006-b; SOUZA *et al.*, 2010).

Diante do exposto, se faz necessário uma maior atenção às questões relacionadas à higiene durante o processamento de produtos de origem animal, e em destaque, àqueles provenientes de suínos. Além disso, deve-se dispensar uma maior atenção também à criação dos animais, implementando monitoramentos microbiológicos para controle dos portadores de *Yersinia enterocolitica* e à possibilidade de propagação da bactéria nos ambientes industriais, uma vez que a importância sanitária da *Y. enterocolitica* ainda é um fato desconhecido e pouco evidente em nosso meio.

Paralelamente, os laboratórios de Saúde Pública devem implantar as análises bacteriológicas visando detectar a real participação de *Y. enterocolitica* nos processos entéricos e outros do homem. Como consequência, os esclarecimentos sobre genótipos circulantes, o arcabouço de virulência, associados às análises de resistência antimicrobiana, se constituiriam nos elementos básicos para o aprofundamento epidemiológico da ocorrência de *Y. enterocolitica* no Brasil.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectiva futura, diante dos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de se ampliar as investigações sobre outros fatores cromossômicos e plasmidiais de virulência não analisados neste estudo. Ademais, deve-se realizar uma contínua análise genotípica através de outras técnicas moleculares, envolvendo um maior número de amostras provenientes de casos humanos e de diversas espécies de animais, com o intuito de aprofundar as análises epidemiológicas e ecológicas dos genótipos circulantes em nosso país.

7 CONCLUSÕES

- As onze amostras de origens animal e humana, do biossrotipo O:3/4 foram positivas para todos os testes fenotípicos, a 37°C e, com exceção do PYZ, apresentaram todos os genes de virulência cromossômicos e o plasmidial. A positividade nos testes fenotípicos e a presença do gene *virF* indicam a possível presença do plasmídeo de virulência.
- Em 9 amostras do Biotipo 1A, de origens animal, alimentar e ambiental, foi detectada a presença do gene cromossomial de virulência *inv*, demonstrando que elas talvez não sejam tão inofensivas quanto o imaginado.
- Algumas cepas apresentaram resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (6), à tetraciclina (7) e à amicacina (1), que são antibióticos utilizados no tratamento de yersiniose extraintestinal, sendo ainda, a amostra YE42 (perfil: AMP, KF,FOX, RL, TE) resistente a 3 classes de antibióticos diferentes (cefalosporina, sulfonamida e tetraciclina), com exceção da ampicilina e cefalotina.
- As 11 amostras que apresentaram todos os fatores de virulência demonstraram uma baixa resistência aos antimicrobianos e, em alguns casos, até mesmo à cefalotina.
- Os dados do ERIC-PCR se compatibilizaram com aqueles do PFGE, demonstrando uma alta similaridade do biossrotipo O:3/4 nos isolados de humanos e animais, além de demonstrar vários genótipos circulantes por algumas regiões do Brasil
- Os representantes do biotipo 1A apresentaram uma maior diversidade genotípica tanto no ERIC-PCR como no PFGE, quando comparados aos do Biotipo 4.

- O ERIC-PCR demonstrou ser uma alternativa mais econômica e rápida na impossibilidade de realização do PFGE.
- O PFGE demonstrou ser a ferramenta mais apropriada para estudos epidemiológicos de *Y. enterocolitica*.
- Com base nos resultados do ERIC-PCR e PFGE sugere-se que, em nosso meio, o suíno também ocupe uma posição de destaque como fonte de infecção no ciclo epidemiológico de *Y. enterocolitica*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN AA, KAMINJOLO JS, LOREGNARD R, KITSON-PIGGOT W. Frequency of isolation of *Yersinia enterocolitica* from Livestock in Trinidad. Vet Rec 1992; 28: 516.

AHVONEN P, THAL E, VASENIUS H. Occurrence *Yersinia enterocolitica* in animals in Finland and Sweden. Contr Microbiol Immun 1973; 2: 135.

ASENSI MD, HOFER E. Pesquisas de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. I. Bacteriologia. São Paulo. Rev Microbiol 1985; 16: 260-268.

ASENSI MD, HOFER E. Pesquisas de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. II. Sorologia. São Paulo. Rev. Microbiol 1986; 17: 58-63.

BAUAB TM, CORRÊA EF, FALCÃO DP. Evaluation of different techniques for the differentiation of pathogenic and non pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. São Paulo. Rev Microbiol 1995; 26:106-111.

BAUMGARTNER A, KUFFER M, SUTER D, JEMMI T, P. ROHNER P. Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. Int J Food Microbiol 2007;115: 110-114.

BHADURI S, CONWAY LK, LACHICA RV. Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol 1987; 25(6):1039-1042.

BHADURI S, WESLEY I, RICHARDS H, DRAUGHON A, WALLACE M. Clonality and antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from U.S market weight hogs. Foodborne Pathog Dis 2009; 6: 351–356.

BLISKA JB, FALKOW S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. PNAS 1992; 89(8): 561-3565.

BÖLIN I, NORLANDER L, WOLF-WATZ H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. Infect Immun 1982; 37: 506-512.

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. J Food Protect 2010; 73(10): 1785-1792.

BONK R., WACHECK S, STUBER E, MEYER C, MÄRTLBAUER E, FREDRIKSSON-AHOMAA M. Antimicrobial Susceptibility and Distribution of β -Lactamase A (*blaA*) and β -Lactamase B (*blaB*) Genes in Enteropathogenic *Yersinia* Species. Microb Drug Resist 2011;17(4): 575-581.

BOTTONE EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microb Infect 1999; 1: 323-333.

BOTTONE EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin Microbiol Rev 1997; 10(2): 257-276.

BOYCE JM, EVANS DJ, EVANS DG, DU PONT HL. Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1979; 25: 532-537.

CAMPIONI F. Tipagem molecular e caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Yersinia enterocolitica* biotipo 1A de origens diversas. [Dissertação]. Ribeirão Preto. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo; 2009. 84 p. Mestrado em Biociências Aplicadas a Saúde.

CARNAHAL A, HAMMONTREE L, BOURGEOIS L, JOSEPH SW. Pyrazinamidase activity as a phenotypic marker for several *Aeromonas* spp. Isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1989; 28(2): 391-392.

CARNIEL E, MOLLARET HH. Yersiniosis. Comp Immun Microbiol Infect Dis 1990; 13: 51-58.

CASTRO AFP, RICCI LC, ALMEIDA ACP, OLIVEIRA MS. Virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs. São Paulo. Rev Microbiol 1983; 14: 48-54.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - PulseNet [homepage]. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services; c2006. Disponível em: http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/yersinia_Apr2006.pdf.

CECCARELLI VRSM, SCHIMIDT C, TRABULSI LR. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em um laboratório da cidade de São Paulo. São Paulo. Rev Microbiol 1990; 21: 364-365.

CHINA B, MICHELS T, CORNELIS GR. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein, YlpA, related to TraT. Mol Microbiol 1990; 4: 1585-1593.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Wayne, PA. Approved standard, CLSI document M100-S21 2011; 31(1): p165.

CORNELIS G, LAROCHE Y, BALLIGAND G, SORY MP, WAUTERS G. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* 1987; 9(1): 64-87.

FÀBREGA A, VILA J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30 (1): 24-32.

FALCÃO JP, BROCCHI M, PROENÇA-MÓDENA JL, ACRANI GO, CORRÊA EF, FALCÃO DP. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. *J Appl Microbiol* 2004; 96: 1230-1236.

FALCÃO JP, FALCÃO DP. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2006; 27(1): 9-19.

FALCÃO JP, FALCÃO DP, SILVA AP, MALASPINA AC, BROCCHI M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1539-1548.

FARMER JJ, CARTER GP, MILER VL, FALKOW S, WACHSMUTH IK. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2589-2594.

FREDRIKSSON-AHOMAA M, AUTIO T, KORKEALA H. Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 308-312.

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

FREDRIKSSON-AHOMAA M, NISKANEN T, BUCHER M, KORTE T, STOLLE A, KORKEALA H. Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 Genotypes Found in Pig Tonsils in Southern Germany and Finland. System Appl Microbiol 2003; 26: 132-137.

FREDRIKSSON-AHOMAA M, , STOLLE A, SIITONEN A, KORKEALA H. Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. J Med Microbiol 2006; 55: 747-749(a).

FREDRIKSSON-AHOMAA M, STOLLE A, KORKEALA H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 315-329(b).

FREDRIKSSON-AHOMAA M, MEYER C, BONKE R, STUBER E, WACHECK S. Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4 / O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs. Lett Appl Microbiol 2010; 50: 412-418.

FREDRIKSSON-AHOMAA M, CERNELA N, HÄCHLER H, STEPHAN R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001 – 2010. Eur J Clin. Microbiol. Infect. Dis 2012; 31(7): 1543-1550.

GEMSKI P, LAZARE JR, CASEY T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1980; 27: 682-685.

HUNTER PR, GASTON MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. J Clin Microbiol 1988; 26(11): 2465-2466.

HURST MRH, BECHER SA, YOUNG ST, NELSON TL, GLARE TR. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. Int J Syst Evol Microbiol 2011; 61: 844-849.

IBRAHIM A, LIESACK W, GRIFFITHS MW, ROBINS-BROWNE RM. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). J Clin Microbiol 1997; 35(6):1636-1638.

KANDOLO K., WAUTERS G. Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. J Clin Microbiol 1985; 21(6): 980-982.

KRAUSHAAR B, DIECKMANN R, WITTEWER M, KNABNER D, KONIETZNY A, MÄDE D, STRAUCH E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype1A strain harbouring an *ail* gene. J Appl Microbiol 2011; 111(4): 997-1005.

JOHNSON JK, ARDUINO SM, STINE OC, JOHNSON JA, HARRIS AD. Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3707-3712.

LÁZARO NS, HOFER E. Anti-*Yersinia enterocolitica* serotype 3 agglutinins in swine sera from Rio de Janeiro. Pesq Vet Bras 1996; 16(4): 121-123.

LEAL TCA. Estudo de marcadores genéticos em *Yersinia enterocolitica*. [Dissertação]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco; 1996. Mestrado em genética.

LEAL TCA, LEAL NC, ALMEIDA AMP. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. Pesq Vet Bras 1997; 17(1): 19-24.

LUKINMAA S, NAKARI UM, EKLUND M & SIITONEN A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of foodborne bacterial pathogens. APMIS 2004; 112: 908–927.

MAGALHÃES VD, FERREIRA JC, BARELLI C, DARINI ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. Rev Inst Adolfo Lutz 2005; 64(2): 155-161.

Manual das doenças transmitidas por alimentos e água. [homepage] Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - SES/SP Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/yersi_entero.htm.

MENDONÇA CL, LÁZARO NS, HOFER E, DUQUE VM. Avaliação de técnicas de isolamento de *Yersinia enterocolitica* em espécimes de suínos. Rev Bras Med Vet 1994; 16: 151-154.

MENDONÇA CL, LÁZARO NS, DUQUE VM, HOFER E. Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos sadios, Rio de Janeiro. Pesq Vet Bras 1995; 15(1):11-14.

MERHEJ V, ADÉKAMBI T, PAGNIER I, RAOULT D, DRANCOURT M. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 779-784.

MICHELIS T, VANOOTEGHEM JC, ROUVROIT CL, CHINA B, GUSTIN A, BOUDRY P, CORNELIS GR. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol 1991; 173(16): 4994-5009.

MILLER VL. Yersinia invasion genes and their products. ASMNews 1992; 58: 26-33.

MILLER VL, BLISKA JB, FALKOW S. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product. J Bacteriol 1990; 172(2): 1062-1069.

MOLLARET HH. Le monde des Yersinioses. Med Mal Infect 1982; 12: 658-663.

MOLLARET HH, BERCOVIER H, ALONSO JM. *Yersinia*. In: Bactériologie Médicale, L. Le Minor et M. Véron (Ed). Paris. Flammarion Médecine-Sciences 1990; 298-315.

MOLLARET HH. Fifteen centuries of Yersiniosis. Contrib Microbiol Immun 1995; 13:1-4.

MURROS-KONTIAINEN A, JOHANSSON P, NISKANEN T, FREDRIKSSON-AHOMAA MF, KORKEALA H, BJÖRKROTH J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. J Syst Evol Microbiol 2011; 61: 2363-2367 (a).

MURROS-KONTIAINEN A, FREDRIKSSON-AHOMAA MF, KORKEALA H, JOHANSSON P, RAHKILA R, BJÖRKROTH J. *Yersinia nurmii* sp. nov. J Syst Evol Microbiol 2011; 61: 2368-2372 (b).

NAKAJIMA H, INOUE M, MORI T, ITOH KI, ARAKAWA E, WATANABE H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. J Clin Microbiol 1992; 30(9): 2484-2486.

NILÉHN B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Path Microbiol Scandinavica 1969; 206: 1-48.

NUNES PM, RICCIARDI ID. *Yersinia enterocolitica*: isolamento concomitante de fezes de humanos e cão. Rev Microb S Paulo 1986; 17: 220-224.

PAI CH, MORS V. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1978; 19: 908-911.

PAIXÃO R. Caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* isoladas em abatedouros e cortes de carne suína no Estado de São Paulo e sua comparação com isolados de casos clínicos humanos. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade da São Paulo; 2010. 111p. Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

PAIXÃO R, DE GOBBI DD, RAIMUNDO DC, HOFER E, MATTE MH, MORENO AM. Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolated from slaughterhouses and pork in the state of São Paulo, Brazil, and clinical cases in humans. Adv Exp Med Biol 2012; 954: 117-122.

PILON J, HIGGIS R, QUESSY S. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Québec. Can Vet J 2000; 41: 383-387.

PORTNOY DA, WOLF-WATZ H, BOLIN I, BEEDER AB, FALKOW S. Characterization of common virulence plasmid in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. Infect Immun 1984; 43: 108-114.

PORTNOY DA, FALKOW S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J Bacteriol 1981; 148: 877-883.

PUJOL C, BLISKA JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. Clin Microbiol 2005; 114: 216-226.

RASMUSSEN HN, RASMUSSEN OF, ANDERSEN JK, OLSEN JE. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. Mol Cell Probes 1994; 8: 99-108.

REVELL PA, MILLER VL. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. FEMS Microbiol Lett 2001; 205: 159-164.

RILEY G, TOMA S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. J Clin Microbiol 1989; 27(1): 213-214.

SACHDEVA P, VIRDI JS. 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 Microbiol Lett 2004; 240: 193–201.

SIHVONEN LM, TOIVONEN S, HAUKKA K, KUUSI M, SKURNIK M, SIITONEN. 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 Microbiol 2011; 11: 42-51.

SKURNIK M., BÖLIN I, HEIKKINEN H, PIHA S, WOLF-WATZ H. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. J Bacteriol 1984; 158(3): 1033-1036.

SOUZA RA, PITONDO-SILVA A, FALCÃO DP, FALCÃO JP. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and identifying species among *Yersinia* isolates. J Microbiol Meth 2010; 82: 141-150.

SPRAGUE LD, NEUBAUER H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 831–835.

SPRAGUE LD, SCHOLZ HC, AMANN S, BUSSE HJ, NEUBAUER H. *Yersinia similis* sp. nov. Int. J Syst Evol Microbiol 2008; 58:952-958.

SULAKVELIDZE A. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*, the ignored species. Microbes Infect 2000; 2: 497–513.

SWAMINATHAN B, HARMON MC, MEHLMAN IJ. A Review *Yersinia enterocolitica*. J Applied Bacteriol 1982; 52: 51-183.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-2239.

THIBODEAU V, FROST EH, CHÉNIER S, QUESSY S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. Can J Vet Res 1999; 63: 96-100.

VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 1991; 19(24): 6823-6831.

WAUTERS G, LE MINOR L, CHALON A. Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann Inst Pasteur 1971; 120: 631-642.

WAUTERS G. Antigens of *Yersinia enterocolitica*. In: *Yersinia enterocolitica*. EJ Bottone (ed), CRC Press, Boca Raton, FL 1981; pp.41-53.

WOJCIECH L, STARONIEWICZ Z, JAKUBCZAK A, UGORSKI M. Typing of *Yersinia enterocolitica* Isolates by ITS Profiling, REP- and ERIC-PCR. J Vet Med 2004; B 51: 238–244.

WON BYUN J, SEEK YOON S, KYUNG LIM S, SOO LEE O, YEAL JUNG B. Hepatic yersiniosis caused by *Yersinia enterocolitica* 4:O3 in an adult dog. J Vet Diagn Invest 2011; 23: 376–378.

WREN BW, TABAQCHALI S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. Lancet 1990; 336: 693.

ZAHORCHAK RJ, BRUBAKER RR. Effect of exogenous nucleotide on Ca²⁺ dependence and V antigen synthesis in *Yersinia pestis*. Infect Immun 1982; 38: 953-959.

ZHENG H, SUN Y, MAO Z, JIANG B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 53:368-374.

