

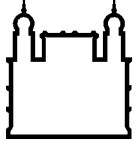
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu de Medicina Tropical

ESTUDO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA*
CIRCULANTES NO BRASIL

LEONARDO ALVES RUSAK

Rio de Janeiro
Junho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LEONARDO ALVES RUSAK

Estudo molecular dos genótipos de *Yersinia enterocolitica* circulantes no Brasil

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

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

RIO DE JANEIRO

2017

Rusak, Leonardo Alves .

Estudo molecular dos genótipos de *Yersinia enterocolitica* circulantes no Brasil. / Leonardo Alves Rusak. - Rio de Janeiro, 2017.

XIX, 153 f.; il.

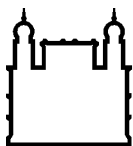
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Marise Dutra Asensi.

Co-orientadora: Deyse Christina Vallim.

Bibliografia: f. 95-123

1. *Yersinia enterocolitica*. 2. Virulência. 3. PCR. 4. Next-generation sequencing. 5. Proteômica . I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: LEONARDO ALVES RUSAK

ESTUDO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA*
CIRCULANTES NO BRASIL

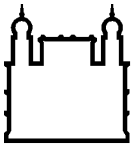
ORIENTADOR (ES): Dra. Marise Dutra Asensi
Dra. Deyse Christina Vallim da Silva

Aprovada em: __12__ / __06__ / __2017__

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ernesto Hofer (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ) - **Presidente**
Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)
Prof. Dr. Elba Regina Sampaio de Lemos (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)
Prof. Dr. Daniela de Pita Pereira (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)
Prof. Dr. Leandro Araujo Lobo (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ)

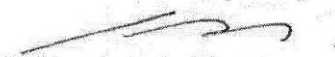
Rio de Janeiro, 12 de junho de 2017



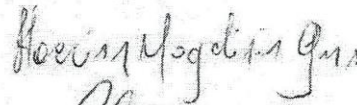
Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

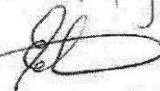
Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Leonardo Alves Rusak**, sob orientação da Dr^a. Marise Dutra Asensi e Dr^a. Deyse Christina Vallim da Silva. Ao décimo segundo dia do mês de junho de dois mil e dezessete, realizou-se às nove horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Estudo molecular dos genótipos de *Yersinia enterocolitica* circulante no Brasil.”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Ernesto Hofer - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Harrison Magdinier Gomes - IOC/FIOCRUZ; Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos - IOC/FIOCRUZ; Dr. Leandro Araujo Lobo - UFRJ/RJ, Dr^a. Daniela de Pita Pereira - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Joseli Maria da Rocha Nogueira – ENSP/FIOCRUZ e Dr^a. Livia Helena Justo da Silva-UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 12 de junho de 2017.


Dr. Ernesto Hofer (Presidente da Banca):

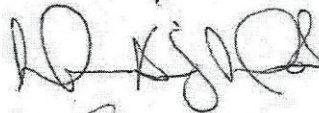
Dr. Harrison Magdinier Gomes (Membro da Banca):



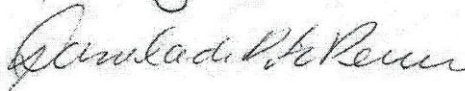
Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos (Membro da Banca):



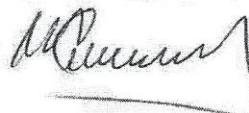
Dr. Leandro Araujo Lobo (Membro da Banca):



Dr^a. Daniela de Pita Pereira (Membro da Banca):



Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):



Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

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 noiva, Vivian, por estar sempre ao meu lado e me dar apoio nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas e, em especial o Dr. Ernesto Hofer, por todo o conhecimento que me foi transmitido, 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.

À Dra. Juliana Pfrimer Falcão, da coleção do Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP), por gentilmente fornecer, para este estudo, 15 amostras de DNA de *Y. enterocolitica* sorotipo O: 3.

A Ricardo Magrani Junqueira pelo auxílio na realização da técnica do sequenciamento de nova geração.

Aos colegas Nathalia Pinho de Souza, Geovane Dias Lopes e a pesquisadora Patrícia Cuervo Escobar do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose; além de Anna Erika Vieira de Araujo e ao pesquisador José Procópio Moreno Senna do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos), pelo auxílio com a técnica de proteômica.

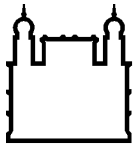
A todos os meus amigos e colegas da Medicina Tropical que enfrentaram comigo as várias horas de aula, além de todas as dificuldades que surgiram durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação

Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pelo auxílio financeiro.

“Aquilo que não nos mata nos torna mais fortes”.

(Friedrich Nietzsche)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

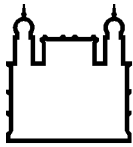
ESTUDO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* CIRCULANTES NO BRASIL RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Leonardo Alves Rusak

Yersinia enterocolitica é um patógeno de natureza zoonótica com crescente relevância em saúde pública em nível global. A infecção no humano registra uma variedade de sinais e sintomas que abrange desde uma gastroenterite autolimitada até uma septicemia fatal. No Brasil, o biossoro tipo 4/O:3 é descrito como o mais comum, sendo transmitido ao homem através da ingestão de alimentos como carne de frango e suína, apresentando com mais frequência um quadro clínico de diarreia. Neste estudo, 72 amostras de origens animal e humana apresentaram uma prevalência dos genes de virulência de 80% para o *inv*, 76% para o *ail*, 76% para o *ystA* e 36% para o *virF*. A presença desses fatores em 40% das amostras de humanos e de animais de *Y. enterocolitica* O:3/4 sugere que o suíno constitui uma importante fonte de infecção e de propagação para o hospedeiro humano de cepas carreadoras de genes de virulência. Entre as amostras do biotipo 1A, a presença do gene *inv* em 60% delas pode ser indicativo de que estas cepas sejam capazes de desencadear infecções. A Duplex-PCR desenvolvida, baseada nos genes *tufA* e *rfbC*, e aplicada no DNA extraído de amostras de fezes, obteve uma detecção rápida do gênero *Yersinia* e do biossoro tipo 4/O:3 de *Y. enterocolitica* respectivamente, quando comparada com a detecção por cultivo. No caso, fezes de pacientes grávidas portadoras (IPPMG-UFRJ) ou não (Petrópolis) de HIV foram analisadas, demonstrando uma prevalência de 18% de *Yersinia* spp. nas fezes de cada grupo. Este resultado revelou a não associação entre o HIV e a probabilidade de ser portador de *Yersinia*. A ausência de isolamento de *Yersinia* do grupo das grávidas HIV+ e a taxa de prevalência igual nos dois grupos sugerem que a melhora imunológica gerada pelo coquetel anti-HIV possa ser a responsável por estes resultados. A aplicação do MLST revelou os STs (*sequence types*) 3, 4, 14, 18, 170 e um novo ST, sendo o ST 18 encontrado em todas as amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4, não importando fonte de isolamento, data ou região da coleta. A difusão do ST 18 tanto em amostras de origem suína quanto humana reforça a hipótese de ser o suíno um elo importante na cadeia de transmissão deste sorotipo ao homem no Brasil. O *Next-Generation Sequencing* demonstrou todo o potencial de virulência das amostras dos sorotipos O:3 e O:5, evidenciando a existência de genes relacionados à motilidade, sistemas de secreção, toxinas, antígeno O (lipopolissacarídeo – LPS), captação de ferro, invasão e aderência. A presença do plasmídeo pSTU288-2 na amostra YE 54, resistente à estreptomicina e tetraciclina, sugeriu que a *Y. enterocolitica* é suscetível à aquisição deste tipo de plasmídeo. Já a proteômica demonstrou a expressão de proteínas ligadas à aquisição de metais, resposta a estresses, virulência e resistência. As Omps (*Outer membrane proteins*) A, C e F possuem características imunogênicas sendo candidatas a marcadores moleculares para ensaios ou vacina. Todos estes resultados demonstram que *Y. enterocolitica* biossoro tipo 4/O:3 apresenta um vasto arsenal adaptativo, justificando a ampla disseminação tanto no Brasil quanto no mundo.

Palavras chave: *Yersinia enterocolitica*, virulência, PCR, Duplex-PCR, NGS, Proteômica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR STUDY OF CIRCULATING *YERSINIA ENTEROCOLITICA* GENOTYPES IN BRAZIL ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Leonardo Alves Rusak

Yersinia enterocolitica is a zoonotic agent with increasing global public health relevance. Regarding clinical aspects, it may cause a wide range of clinical manifestations such as gastrointestinal diseases and extraintestinal disorders. In Brazil, the main bioserotype 4/O:3 is typically transmitted via the fecal-oral (chicken and swine meat) route to humans and animals, and Diarrhea is the most frequent clinical manifestation in humans. In a total of 72 strains of human and animal origins, 80% presented *inv* gene, 76% presented *ail* gene, 76% presented *ystA* gene and 36% presented *virF* gene. The presence of all virulence genes in 40% of *Y. enterocolitica* 4/O:3 strains from human and animal origins, suggest that the swine could be an important reservoir and possible source of strains carrying virulence genes to human. Among biotype 1A strains, the presence of the *inv* gene in 60% can indicate the pathogenic potential of the representatives of this biotype. The developed Duplex-PCR was based on the *tufA* and *rfbC* genes, and obtained a faster detection of the *Yersinia* genus and *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3 representatives than cultivation when applied to extracted DNA from faeces. To evaluate the developed technique, we analyzed faeces from pregnant patients with HIV (IPPMG-UFRJ) and without HIV (Petrópolis), which revealed an incidence rate of 18% of *Yersinia* spp. in the faeces of both groups. This result showed the non-association between HIV and the probability of being a carrier of *Yersinia*. Furthermore, the absence of *Yersinia* isolation from the HIV + pregnant group and the equal incidence rate in the two groups suggest that the immune enhancement generated by anti-retroviral therapy may be responsible for these results. STs 3, 4, 14, 18, 170 and new ST were found through the MLST. All samples of *Y. enterocolitica* O:3/4, regardless of isolation source, period or collection region belonged to ST 18. Still, the ST 18 diffusion in both, swine and human samples, reinforces the hypothesis that the swine is an important link in the transmission chain of this serotype to man in Brazil. NGS revealed the virulence potential of the O:3 and O:5 serotypes samples, demonstrating the existence of genes related to motility, the secretion system, toxins, the O antigen (lipopolysaccharide - LPS), hemin uptake, invasion, and adherence. Moreover, it showed the presence of the pSTU288-2 plasmid in the YE 54 sample, conferring resistance to streptomycin and tetracycline, suggesting that *Y. enterocolitica* is susceptible to the acquisition of this type of plasmid. Proteomics demonstrated the expression of proteins linked to metal acquisition, stress response, virulence and antibiotic resistance. Omp A, C and F have immunogenic characteristics and they could be candidates as diagnostic markers for pathogenic *Yersinia enterocolitica*, or could be used as vaccine targets. In conclusion, These results suggest that *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3 harbors a set of virulence determinants that may play role in host pathoadaptation, thus it justifies the successful dissemination in Brazil and worldwide.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, virulence, PCR, Duplex-PCR, NGS, Proteomics.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	1
1.2 Taxonomia	2
1.3 Características morfológicas e fenotípicas	4
1.4 Yersiniose nos animais	4
1.5 Yersiniose no homem.....	7
1.6 Yersiniose no Brasil	11
1.7 A fisiopatologia da infecção	12
1.8 Mecanismos de patogenicidade cromossomiais	14
1.9 Mecanismos de patogenicidade plasmidiais.....	18
1.10 Diagnóstico laboratorial.....	23
1.10.1 Processo clássico	23
1.10.2 Diagnóstico molecular.....	25
1.11 Resistência aos antimicrobianos e tratamento	27
1.12 Genotipagem por “ <i>Multilocus Sequence Typing</i> ” (MLST)	28
1.13 Sequenciamento de nova geração - <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS)	29
1.14 Proteômica.....	32
1.15 Justificativa e relevância	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Amostragem e fluxograma do estudo	36
3.2 Análise da presença de <i>Y. enterocolitica</i> nas fezes de grávidas HIV positivas.	37
3.3 Cultura para <i>Yersinia</i>	38
3.4 Caracterização bioquímica e sorológica	39
3.5 Extração de DNA	40
3.6 Duplex-PCR para detecção de <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo O:3.	40

3.7	Detecção molecular dos genes de virulência através da PCR.....	42
3.8	Genotipagem pelo MLST	43
3.9	Proteômica.....	44
3.10	Sequenciamento de nova geração (<i>Next-Generation Sequencing</i> - NGS)	48
4	RESULTADOS	51
4.1	Detecção molecular dos genes de virulência de cepas de <i>Y. enterocolitica</i> isoladas de fonte animal e humana através da PCR.....	51
4.2	Duplex-PCR para detecção/identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo O:3.....	54
4.3	Análise da presença de <i>Y. enterocolitica</i> nas fezes pela Duplex-PCR	60
4.4	MLST	62
4.5	Sequenciamento de nova geração.....	64
4.6	Proteômica.....	69
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	92
7	PERSPECTIVAS	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ANEXO I – ARTIGO: PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ANALYSIS OF BIOSEROTYPES OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* FROM VARIOUS SOURCES IN BRAZIL.

ANEXO II – ARTIGO: NEXT-GENERATION SEQUENCING VIRULOME ANALYSIS OF A *YERSINIA ENTEROCOLITICA* SUBSP. *PALEARCTICA* BIOSEROTYPE 4/O:3 ST18 ISOLATED FROM HUMAN BLOOD IN BRAZIL.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 - Modelo de patogênese por <i>Yersinia enterocolitica</i> . (1) Células de <i>Yersinia</i> atravessam o epitélio intestinal pelas células epiteliais em direção à submucosa. (2) Os macrófagos da submucosa fagocitam o patógeno, entram no sistema linfático e vão em direção ao linfonodo mesentérico (LNM). (3) Alternativamente, as células bacterianas podem ser fagocitadas pelas células M. (4) Uma vez nas placas de Peyer (PP) a <i>Yersinia</i> forma microcolônias e começa a replicação. (5) Ainda, as células bacterianas localizadas no LNM podem também formar microcolônias o que permite a sua replicação. (adaptado de Fábrega; Vila (2012)).....	14
Figura 1-2 - Mapa genético do plasmídio de virulência (pYV) de <i>Y. enterocolitica</i> sorotipo O:9, demonstrando o local, a direção de transcrição e a função de cada gene. (adaptado de Robins-Brown (2007)).....	19
Figura 3-1 - Fluxograma mostrando o caminho que as amostras do grupo 1 seguiram dentro do estudo. PCR - <i>Polimerase Chain Reaction</i> ; MLST - <i>Multilocus Sequence Typing</i>	36
Figura 3-2 - Fluxograma mostrando o caminho que as amostras do grupo 2 seguiram dentro do estudo. PCR - <i>Polimerase Chain Reaction</i> ; MLST - <i>Multilocus Sequence Typing</i>	36
Figura 3-3 – Fluxograma mostrando o caminho que a amostra do grupo 3 seguiu dentro do estudo. PCR - <i>Polimerase Chain Reaction</i> ; MLST - <i>Multilocus Sequence Typing</i> .	37
Figura 3-4 - Cálculo do conteúdo proteico total (<i>Total protein</i>) (Adaptado de Wisniewski; Rakus (2014a)).....	48
Figura 3-5 - Concentração molar de proteínas (Adaptado de Wisniewski; Rakus (2014a)).....	48
Figura 4-1 - Figura demonstrativa da reação da Duplex-PCR para detecção dos genes <i>rfbC</i> (405bp) e <i>tufA</i> (587pb). Controles Negativos de 2 a 6; Controles do gênero <i>Yersinia</i> de 7 a 10; Controles de <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo O:3 de 11 a 12; Faixa 1 – Padrão de peso molecular 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, USA); Faixa 2 - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; Faixa 3- <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 10708; Faixa 4 - <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090; Faixa 5 - <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29513; Faixa 6 – <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29004; Faixa 7 - <i>Yersinia kristensenii</i> CIP 9993; Faixa 8 - <i>Yersinia frederiksenii</i> CIP 8029; Faixa 9 - <i>Yersinia ruckerii</i> ATCC 29473; Faixa 10 - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IAL 1793; Faixa 11 - <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo O:3 (YE 54); Faixa 12- <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo O:3 CIP 81.41; Faixa 13 - branco.....	55

Figura 4-2 – Alinhamento das sequências dos iniciadores *tufA* com as sequências do gene *tufA* mais próximas da sequência da cepa CIP 81.41 dentro do gênero *Yersinia*. A) Alinhamento com o iniciador *forward* do gene *tufA*. B) Alinhamento com o iniciador *reverse* do gene *tufA*. A= adenina; C= citosina; G= guanina; T= timina; R = G ou A..... 58

Figura 4-3 - Alinhamento das sequências dos iniciadores *tufA* com as sequências do gene *tufA* mais próximas da sequência da cepa CIP 81.41 fora do gênero *Yersinia*. A) Alinhamento com o iniciador *forward* do gene *tufA*. B) Alinhamento com o iniciador *reverse* do gene *tufA*. A= adenina; C= citosina; G= guanina; T= timina; R = G ou A..... 59

Figura 4-4 - Árvore demonstrando a correlação filogenética de todos os *sequence types* (STs). As setas indicam os STs encontrados, além de indicar a posição do novo ST..... 63

Figura 4-5 - Mapa genético da YE 19 demonstrando a localização de cada gene de virulência em seu genoma..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1 - Resultado da PCR dos genes de virulência, fonte, ano da coleta e sorotipo/biotipo das 72 amostras de <i>Y. enterocolitica</i> analisadas.....	51
Tabela 4-2 - Frequência dos genes de virulência nas 72 amostras de <i>Y. enterocolitica</i> . ..	53
Tabela 4-3 - Frequência dos genes de virulência por sorotipos/biotipos das 72 amostras de <i>Y. enterocolitica</i>	54
Tabela 4-4 - Frequência dos genes de virulência por fonte de isolamento das 72 amostras de <i>Y. enterocolitica</i>	54
Tabela 4-5 – Resultado da Duplex-PCR para amplificação de <i>tufA</i> e <i>rfbC</i> em todas as amostras de <i>Yersinia</i> da CLIST e dos controles negativos.	56
Tabela 4-6 – Resultados da Duplex-PCR e do isolamento no crescimento bacteriano das 74 amostras de fezes de cada grupo.....	60
Tabela 4-7 - Correlação entre o <i>Sequence type</i> e o biotipo/sorotipo das cepas de <i>Y. enterocolitica</i> analisadas.	62
Tabela 4-8 - Dados genômicos das cinco amostras de <i>Y. enterocolitica</i> analisadas.	64
Tabela 4-9 - Genes de virulência e resistência encontrados nas amostras de <i>Y. enterocolitica</i> analisadas.	65
Tabela 4-10 - Principais proteínas de virulência e resistência identificadas na amostra YE 54 (O:3/4 – humana).	70
Tabela 4-11 - Principais proteínas que tiveram sua expressão modificada pela temperatura na amostra YE 54.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-1 - Correlação do biotipo com o sorotipo de <i>Y. enterocolitica</i> (adaptado de Robins-Browne (2007)).	3
Quadro 3-1- Preparo do <i>Cold manithol broth</i>	38
Quadro 3-2 - Biotipificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> (Wauters (1981); Mollaret et al.(1990)).	39
Quadro 3-3 - Amostras de <i>Yersinia</i> e do controle negativo avaliadas com a Duplex-PCR.	41
Quadro 3-4 - Iniciadores dos genes de virulência <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>virF</i> e <i>ystA</i> e seus respectivos amplicons.	42
Quadro 3-5 - Iniciadores do MLST com o tamanho dos seus produtos e temperaturas de anelamento.	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2DE	eletroforese bidimensional
AL	alimento
AN	animal
APA	água peptonada alcalina
ARG-ANNOT	<i>Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	Bahia
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BS	Ágar Bismuto Sulfito
BSA	bovine serum albumin
C	clorofenicol
C.V.	Meio Costa & Vérnin
CCUG	Culture Collection of the University of Gothenburg
CIN	Ágar Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina
CIP	Collection del'Institut Pasteur
CLIST	Coleção de Listeria
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	gentamicina
Csps	<i>cold shock proteins</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DB	<i>digestion buffer</i>
DTT	Ditiotreitol
EFSA	European Food Safety Authority
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
ESI	<i>electrospray ionization</i>
F	<i>forward</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FLASH	<i>Fast Length Adjustment of Short reads</i>
GMP _c	Monofosfato cíclico de guanosina
HCD	<i>higher energy collision dissociation</i>
HE	Ágar Entérico Hektoen
hemocomp.	hemocomponente

HMM	alta massa molecular
HPI	<i>High Pathogenicity Island</i>
HU	humana
IAA	Iodoacetamida
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Inv	Invasina
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
KIA	Ágar Kligler-Ferro
LABZOO	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
LB	<i>lysis buffer</i>
LC	cromatografia líquida
LMM	baixa massa molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight</i>
MED-FASP	<i>Multi-enzyme digestion - Filter Aided Sample Preparation</i>
MG	Minas Gerais
MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
<i>myf</i>	<i>mucoïd Yersinia fator</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
NT	não tipável
ODC	ornitina descarboxilase
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
PBPs	proteínas de ligação da penicilina
PBS	salina fosfatada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Pernambuco
PER	primers multiplex de extensão
PET	Petrópolis
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PR	Paraná
PSB	salina fosfatada suplementada com sorbitol ou sais biliares

pYV	<i>plasmid Yersinia Virulence</i>
QUAST	<i>Quality Assessment Tool</i>
R	<i>reverse</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
REAC	<i>Restriction Enzyme Analysis of Chromosomes</i>
REAP	<i>Restriction Enzyme Analysis of Plasmids</i>
REAPR	<i>Recognition of Errors in Assemblies using Paired Reads</i>
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
S	estreptomicina
SC	Santa Catarina
SES/SP	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
SIM	Motilidade, Indol, Sulfeto
SP	São Paulo
SS	Ágar Salmonella-Shigella
ST I	Toxina termoestável tipo I
ST	<i>sequence type</i>
Subps	Subespécie
T2SS	sistemas de secreção do tipo II
T3SS	sistemas de secreção do tipo III
TA	temperatura ambiente
TE	tetraciclina
TPA	<i>Total Protein Approach</i>
TSA	teste de sensibilidade aos antibióticos
TSI	Ágar Triplice Açúcar Ferro
UFC	unidades formadoras de colônia
VFDB	<i>Virulence Factors of Bacterial Pathogens</i>
VP	Voges-Proskauer
XLD	Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
YlpA	<i>Yersinia lipoprotein A</i>
Yops	<i>Yersinia outer membrane proteins</i>
Ysa	<i>Yersinia secretion apparatus</i>
Ysps	proteínas efectoras de Ysa

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica é um microrganismo Gram-negativo difundido por várias partes do mundo, particularmente em países europeus (BOTTONNE, 1977). A sua história teve início nos EUA, em meados de 1934, quando McIver e Pike isolaram um pequeno cocobacilo Gram-negativo de dois abscessos faciais de um fazendeiro de 54 anos. A esse microrganismo eles deram o nome de *Flavobacterium pseudomallei* (BOTTONNE, 1997). Em 1939, Schleifstein e Coleman, de posse do microrganismo isolado por McIver e Pike, começaram a estudá-lo e o compararam com quatro outros patógenos humanos, aos quais eles deram os nomes de *Actinobacillus lignieri* e *Pasteurella (Yersinia) pseudotuberculosis* (BOTTONNE, 1997). Após a realização das análises, perceberam que essa nova espécie se assemelhava a *Pasteurella pseudotuberculosis*, tendo em vista que esse novo patógeno humano era de origem entérica, lhe deram o nome de *Bacterium enterocoliticum* (SWAMINATHAN et al., 1982; BOTTONNE, 1997). Pouco se ouviu falar sobre *B. enterocoliticum* pelos 20 anos que se seguiram após a sua descoberta (SWAMINATHAN et al., 1982). Não obstante, na Europa, vários investigadores não pouparam esforços para identificação de espécies bacterianas, que ainda não possuíam um nome, isoladas de hospedeiros como chinchila, lebre e suíno, os quais atuavam como reservatórios (BOTTONNE, 1977). No início da década de 1960, microbiologistas veterinários e clínicos começaram a dar diversos nomes para estes isolados: *Pasteurella pseudotuberculosis-like*, *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo B, *Pasteurella X*, *Pasteurella Y* e Germe X (SWAMINATHAN et al., 1982). Em 1963, foi estabelecida a similaridade entre cepas americanas e europeias, de origens humana e animal, de seus epítetos anteriormente mencionados (BOTTONNE, 1977). Em 1964, Frederiksen observando a semelhança entre a *Pasteurella X*, outros isolados e o *B. enterocoliticum* de McIver e Pike (1939) propôs o nome de *Yersinia enterocolitica* para esta espécie (SWAMINATHAN et al., 1982).

A espécie *Y. enterocolitica* compreende um grupo fascinante e heterogêneo de bactérias que vem desafiando a capacidade de microbiologistas, epidemiologistas e toxicologistas há anos (SWAMINATHAN et al, 1982). Tanto que Bottone lhe deu a alcunha de bactéria carismática nos estudos publicados em 1977 e 1997 (BOTTONNE, 1977; 1997).

Y. enterocolitica é uma bactéria de natureza zoonótica com relevância em saúde pública, distribuída de forma ubiqüitária na natureza, em reservatórios aquáticos e animais

(BOTTONNE, 1997; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2012). Trata-se de um patógeno gastrointestinal de distribuição cosmopolita e isolado de humanos em vários países ao redor do mundo, principalmente em áreas de clima mais frio como Canadá, EUA, costa oeste da América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e Europa. Em 2009, *Y. enterocolitica* era a terceira principal causa de diarreia de origem bacteriana na Europa, ficando atrás somente dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter*, além de ser considerada o principal agente causador de yersiniose pelo mundo (GIERCZYŃSKI et al., 2007; EFSA, 2011; DRUMMOND et al., 2012; SAVIN et al., 2013).

Atualmente, *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, biotipo 4, é encontrado com maior frequência em casos clínicos no Brasil e no mundo, respondendo por cerca de 80 a 90% dos isolados de origem humana na Alemanha e no restante da Europa, demonstrando assim a sua crescente relevância em saúde pública em nível global (BATZILLA et al., 2011a).

1.2 Taxonomia

O gênero *Yersinia*, o qual recebeu esse nome em homenagem a Alexander Emile Jean Yersin (médico francês que isolou e identificou pela primeira vez o bacilo da peste), pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae* (BOTTONNE, 1997), sendo atualmente composto por 19 espécies segundo o *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (<http://www.bacterio.net/>). São elas: *Yersinia aldovae*, *Yersinia aleksiciae*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia entomophaga*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia massiliensis*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia nurmii*, *Yersinia pekkanenii*, *Yersinia pestis*, *Yersinia philomiragia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia ruckeri*, *Yersinia similis* e *Yersinia wautersii*, das quais apenas três são patogênicas para o homem e os animais: *Y. pestis* (agente da peste bubônica), *Y. pseudotuberculosis* (bacilo de Malassez e Vignal) e *Y. enterocolitica* (BOTTONNE, 1999).

Y. enterocolitica, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* faziam parte de um grupo conhecido como *Y. enterocolitica*-like, que no entanto, baseado na heterogeneidade bioquímica e comparação direta de DNA, ficou provado que tratavam-se de organismos diferentes, sendo separados em quatro espécies como são conhecidas até hoje (BOTTONNE, 1997; DRUMMOND et al., 2012).

A partir das análises de hibridização de DNA e diferenças nas sequências do gene 16S do RNAr a espécie *Y. enterocolitica* foi dividida em 2 subespécies: subsp. *enterocolitica* proposta para cepas que possuem RNAr 16S do tipo americano (biotipo 1B) e subsp.

Palearctica proposta para àquelas que possuem RNAr 16S do tipo europeu (biótipo 1A e 2-5) (NEUBAUER et al., 2000a; BATZILLA et al., 2011a).

Do ponto de vista bioquímico, apresenta seis biotipos sendo que 1B, 2, 3, 4 e 5, estão envolvidos em processos patológicos humanos e animais (BOTTONNE, 1999). Já, os representantes do biotipo 1A, que outrora eram tidos como não patogênicos e ambientais, começam a figurar como agentes etiológicos de certas doenças gastrointestinais, considerando a detecção de genes de virulência nos mesmos (PAIXÃO et al., 2013b). Quanto aos antígenos, a espécie possui 44 antígenos flagelares e 76 somáticos, sendo somente os somáticos utilizados na sorotipagem, para identificação laboratorial (FALCÃO; FALCÃO, 2006). No Quadro 1-1 é apresentado a correlação de cada biotipo com seus sorotipos associados. Dentre os grupos sorológicos reconhecidos, salientam-se O:1, 2, 3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32; O:5,27; O:13a,13b; O:18; O:20 e O:21 como agentes causadores de doença no homem e nos animais (ROBINS-BROWNE, 2007; DRUMMOND et al., 2012). Já, os biossorotipos predominantemente associados a doenças em humanos são: 4/O:3, 1B/O:8, 2/O:9 e 2/O:5,27. Os de maior prevalência nas infecções zoonóticas são o O:3 e O:9 (BOTTONNE, 1997). Como anteriormente foi citado, o biossorotipo 4/O:3 corresponde a aproximadamente 80 a 90% dos isolados de origem humana na Europa, com crescente relevância global (BATZILLA et al., 2011a).

Biotipo	Sorotipo
1A	O:4; O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16; O:21; O:22; O:25; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57; NT*
1B	O:4,32; O:8; O:13a,13b; O:16; O:18; O:20; O:21; O:25; O:41,42; NT*
2	O:5,27; O:9; O:27
3	O:1,2,3; O:3; O:5,27
4	O:3
5	O:2,3

Quadro 1-1 - Correlação do biotipo com o sorotipo de *Y. enterocolitica* (adaptado de Robins-Browne (2007)).

*NT = não tipável.

Esse esquema antigênico ainda é compartilhado com as outras espécies de *Yersinia*, excetuando-se *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*, contudo, pode ocorrer reação cruzada com espécies de *Brucella* e sorovares de *Salmonella enterica* (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

Y. enterocolitica ainda pode ser classificada pela fagotipagem: II, VIII, IX_a, IX_b, XI, X, X₃, X_z e X₀, sendo o fagotipo VIII geralmente associado ao biossorotipo 4/O:3 e, predominante no Brasil (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

1.3 Características morfológicas e fenotípicas

Y. enterocolitica é um pequeno bacilo com 0,5 x 0,8 µm de largura por 1 x 3 µm de comprimento, Gram-negativo, não esporulado, possui flagelos peritríquios além de ser móvel a 25°C e imóvel a 37°C. Predominam as formas cocóides quando em cultivo jovem de 22° a 25°C e, em culturas mais velhas a 37°C, os bacilos tendem ao pleomorfismo. São psicrotróficos (resistem bem ao congelamento), podendo se multiplicar em temperaturas que variam de 0 a 44°C, tendo temperatura ótima de crescimento entre 25 a 28°C, além disso são anaeróbios facultativos (SWAMINATHAN et al., 1982; BOTTONE, 1999; FALCÃO; FALCÃO, 2006; DRUMMOND et al., 2012). Crescem numa faixa ampla de pH que varia de 4 a 10, no entanto, a ideal é ao redor de pH 7,6 (FALCÃO; FALCÃO, 2006). Suporta e cresce em uma concentração máxima de 5% de sal (NaCl) (BARI et al., 2011).

Cepas de *Y. enterocolitica* costumam crescer bem em uma grande variedade de meios de cultura como o ágar triptose de soja, ágar sangue e em meios líquidos como caldo simples e água peptonada, se desenvolvem de forma abundante (SWAMINATHAN et al., 1982; FALCÃO; FALCÃO, 2006). Apresenta um crescimento satisfatório, porém lento, na maioria dos meios de cultura seletivos-indicadores empregados rotineiramente no diagnóstico de enterobactérias patogênicas como: Ágar Sulfito Bismuto (BS), Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), Ágar Entérico Hektoen (HE), Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), Ágar MacConkey, Ágar Salmonella-Shigella (SS) e Ágar Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (CIN) (SWAMINATHAN et al., 1982; BOTTONE, 1999; FALCÃO; FALCÃO, 2006).

Y. enterocolitica sensu stricto se distingue das espécies *Y. enterocolitica*-like com base na fermentação da sacarose, L-raminose, rafinose e melibiose (BOTTONE, 2015). No entanto, trata-se de uma espécie com uma considerável heterogeneidade bioquímica, resultando na caracterização de seis biotipos anteriormente citados (Quadro 1-1). As principais provas bioquímicas utilizadas nessa biotipagem são: lipase, salicina, esculina, xilose, trealose, produção do indol, descarboxilação do aminoácido ornitina, teste de Voges-Proskauer, atividade da Pirazinamidase, sorbose, inositol, redução do nitrato e sacarose (Quadro 3-2) (BOTTONE, 2015).

1.4 Yersiniose nos animais

Os representantes do reino animal têm atuado de forma significativa como reservatórios de *Y. enterocolitica* (SWAMINATHAN et al., 1982). Epidemiologicamente, *Y. enterocolitica* é um microrganismo largamente difundido na natureza, ocorrendo no trato

gastrointestinal de diversos tipos de animais, envolvendo mamíferos e aves, bem como àqueles de sangue frio, todos atuando como hospedeiros (BOTTONNE, 1999). De forma mais específica, salienta-se que inúmeras espécies domésticas já foram incriminadas como reservatórios, citando-se: caninos, felinos, bovinos, ovinos e equinos (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006; BARI et al., 2011). Além desses, aparecem na lista de possíveis reservatórios os roedores, primatas, cervídeos e a raposa (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006).

A via oral é a principal forma de contaminação dos animais, adquirida através da ingestão de alimentos, incluindo 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).

Quando se trata de *Y. enterocolitica* em animais, o suíno figura com papel de destaque, com base nas inúmeras investigações realizadas o incriminando como principal elemento na cadeia de transmissão da bactéria ao homem (DICKINSON; MOCQUOT, 1961; ESSEVELD; GOUDZWAARD, 1973; SWAMINATHAN et al., 1982; BOTTONNE, 1999; PILON et al., 2000; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001; 2006b; 2010; 2012; ORTIZ MARTÍNEZ et al., 2010; DRUMMOND et al., 2012; VIRTANEN et al., 2013). O suíno se constitui no principal reservatório de *Y. enterocolitica* em razão de duas causas: 1 - pelo número elevado de suínos que são portadores assintomáticos, tornando-os uma importante fonte de infecção e de propagação nas diversas biocenoses (NESBAKKEN et al., 2003); 2 - pelo fato de o suíno albergar os biossorotipos patogênicos ao homem, salientando-se o 4/O:3 e o 2/O:9 (NESBAKKEN et al., 2003; DRUMMOND et al., 2012).

Apesar do grande número de portadores hígidos, a infecção por *Y. enterocolitica* no suíno pode causar quadros clínicos entéricos graves e, em menor proporção, ao nível extraintestinal (LÁZARO; HOFER, 1996). Suínos em seus criadouros são frequentemente colonizados por *Y. enterocolitica* patogênica em suas tonsilas palatinas, assim como eliminam o patógeno através das fezes. Com isso, a pesquisa nas tonsilas pode prover uma estimativa mais acurada da ocorrência da infecção por *Y. enterocolitica* do que uma análise através da coprocultura (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2009).

Os ensaios experimentais da infecção oral por *Y. enterocolitica* em suínos por um período de até 72 horas demonstraram a sua colonização, além dos tecidos das tonsilas palatinas, nos linfonodos retrofaríngeos propagando-se ao esôfago, estômago, fígado, baço, duodeno, jejuno, íleo, cólon e os linfonodos mesentéricos. Todavia, a identificação do patógeno nas tonsilas palatinas persiste algumas semanas ou meses após ter cessado a sua

eliminação ou presença nas fezes. A retirada das tonsilas palatinas durante o processamento da carne de suínos nos abatedouros é recomendada, em alguns países, inclusive no Brasil, na tentativa de minimizar a contaminação para a carcaça e produtos derivados. (BRASIL, 1995; THIBODEAU et al., 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2004). Por outro lado, a sua capacidade de preservação nas tonsilas e 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 (BOTTONNE, 1997).

Um estudo de dois anos, realizado na Inglaterra, para observar a prevalência de *Yersinia* enteropatogênica entre 630 suínos, apontou que 44% eram colonizados por *Y. enterocolitica*. Quando a análise foi feita pelo número de fazendas, constatou-se que 31 das 45 fazendas foram positivas para a presença do patógeno e os bio sorotipos mais comumente encontrados foram o 2/O:9 (33%) e o 2/O:5 (26%) (ORTIZ MARTÍNEZ et al., 2010).

Na Suíça, um estudo foi conduzido para observar a prevalência de *Y. enterocolitica* patogênica em seus abatedouros. Lançando mão da técnica de *real-time* PCR (utilizando o gene *ail* como alvo) foi constatado que 70% (148 /212) das tonsilas palatinas analisadas estavam colonizadas com *Y. enterocolitica*, sendo o bio sorotipo 4/O:3 dominante, respondendo por 96% das amostras positivas (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007). Estudos similares realizados na Finlândia e Alemanha também apontaram o bio sorotipo 4/O:3 como sendo o mais frequentemente isolado das tonsilas palatinas de suínos na parte final da linha de abate (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2003).

Apesar de a Europa concentrar o maior número de estudos de *Y. enterocolitica* em suínos, outras partes do mundo também figuram como centros importantes de estudo nesta área (DRUMMOND et al., 2012). Bhaduri e colaboradores (2005) realizaram um estudo para determinar a prevalência de *Y. enterocolitica* patogênica em suínos nos EUA, analisando 2.793 amostras de fezes, de 77 criadouros, distribuídos por 15 estados do Leste e Meio Oeste Americano, durante 27 semanas. A prevalência foi definida como 13,1% (366/ 2.793) quando combinados os resultados da cultura positiva com aqueles da PCR. Com base nos resultados, os autores concluíram que o suíno tanto nos EUA, como em outras partes do mundo, é o principal reservatório de *Y. enterocolitica* potencialmente patogênica para o homem (BHADURI et al., 2005).

Fora do eixo Europa-EUA, salienta-se as observações feitas por Liang e colaboradores (2012) na China, que analisaram a prevalência de *Y. enterocolitica* em suínos de abatedouros de 11 províncias no período de 2009 a 2011. Foram investigadas 8.773 amostras, colhidas por swab oral (tonsilas), conteúdo intestinal e fezes. Obtiveram 1.132 isolados de *Y. enterocolitica*, sendo 850 representantes dos bio sorotipos patogênicos, dos quais 844 foram

caracterizados como biossoro tipo 3/O:3. As análises de todas as amostras patogênicas através do PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) permitiram determinar e relacionar com os pulsotipos de amostras humanas isolados de processos diarreicos com aqueles oriundos de suínos da mesma região, confirmando geneticamente a associação dos isolados de infecções humanas e de suínos (LIANG et al., 2012).

Na maioria dos países europeus como nos EUA, a notificação de casos de *Y. enterocolitica* em animais não é compulsória, logo os dados de epidemiologia zoonótica permanecem incompletos (EFSA, 2011; DRUMMOND et al., 2012).

Em síntese, o suíno e seus produtos, ocupam uma posição de destaque como fonte de infecção e de veiculação de determinados biossoro tipos de *Y. enterocolitica* para os seres humanos (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a).

1.5 Yersiniose no homem

Desde que Frederiksen, em 1964, propôs o nome de *Yersinia enterocolitica* a esta bactéria, diversos casos em humanos tem sido reportados com mais frequência, sendo mais precisamente relatados como casos isolados de infecções não usuais (BOTTONNE, 1983).

A yersiniose é uma doença de origem alimentar que tem se tornado cada vez mais prevalente nos últimos anos devido à sua via de transmissão fecal-oral e a sua prevalência em animais de criação, tendo como agente primordial *Y. enterocolitica* e em menor frequência *Y. pseudotuberculosis* (DRUMMOND et al., 2012).

As mais altas taxas de incidência da infecção são reportadas em crianças de até quatro anos de idade, as quais costumam apresentar uma diarreia autolimitada, por vezes com sangue (BOTTONNE, 1997; DRUMMOND et al., 2012). Crianças acima de cinco anos e adultos costumam apresentar febre e dor abdominal com episódios de diarreia e/ou vômito (BOTTONNE, 1997; ZHENG et al., 2007). Dependendo da idade e do estado de saúde do hospedeiro, as manifestações clínicas gastrointestinais podem variar (BOTTONNE, 1999; DRUMMOND et al., 2012). A literatura registra um largo espectro de sinais e sintomas como febre, diarreia, náuseas, vômitos e dores abdominais; tendo, portanto, um perfil clínico que abrange desde uma gastroenterite autolimitada, passando por enterocolite, linfadenite mesentérica aguda (mimetizando apendicite), ileíte terminal e até uma septicemia fatal (BOTTONNE, 1997; ZHENG et al., 2008). Salienta-se que a septicemia/ bacteremia 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. Embora as complicações extra-intestinais sejam um evento raro, *Y. enterocolitica* pode se desenvolver em qualquer tecido do corpo e, além da septicemia, as infecções metastáticas que podem ocorrer desencadeiam um espectro variado de sintomas clínicos compreendidos por abscessos no fígado, baço, rim e intestino, pneumonia, artrite séptica, meningite, endocardite, infecções cutâneas incluindo celulite, osteomielite e faringite (BOTTONNE, 1997; FALCÃO; FALCÃO, 2006; 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 deste 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, inclusive com relatos de transmissão através da transfusão de sangue (BOTTONNE, 1997, 1999; THIBODEAU et al., 1999). Em 1999, Bottone citou 49 casos (desde 1975 até 1997), 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 1970, 1980 e 1990, e tiveram como maior prevalência os sorotipos O:3 e O:9. *Y. enterocolitica* emergiu como uma das causas de bacteremia associada à transfusão de sangue 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).

Ainda, nas rotas não usuais de transmissão de *Y. enterocolitica*, alguns trabalhos sugerem uma transmissão por vetores, uma vez que já foram isoladas de moscas encontradas em ambientes de criação de galinhas e porcos (FUKUSHIMA et al., 1979; GALINDO et al., 2011). No entanto, o papel do artrópode/inseto atuando como vetor na cadeia de transmissão de *Yersinia* enteropatogênica entre o animal e o homem ainda é uma hipótese que precisa ser comprovada (GALINDO et al., 2011). Contudo, o que se sabe nesse sentido é que moscas podem atuar na disseminação de infecções nosocomiais, carreando mecanicamente as bactérias de um ponto a outro, como relatado em hospitais da Líbia, onde já foram encontradas moscas contaminadas com cepas resistentes a antibióticos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (RAHUMA et al., 2005).

A sazonalidade parece desempenhar um papel fundamental na incidência de infecções por *Y. enterocolitica* em algumas regiões do mundo, as quais apresentam picos de incidência nos períodos mais frios do ano (BOTTONNE, 1999). Regiões como a Itália, Bélgica, antiga Checoslováquia (atualmente República Checa e Eslováquia) e Escandinávia apresentaram picos de incidência isolados no período compreendido entre o fim do outono e início de inverno (TAUXE et al., 1986; BOTTONNE, 1999). No entanto, algumas outras regiões como a Austrália, África do Sul, Canadá, Holanda, Japão e EUA, não demonstraram essa relação, tendo as variações nos picos de incidência concentrados a outros fatores como os níveis de consumo de produtos cárneos suínos, o contato com os reservatórios animais, etc (BOTTONNE, 1999).

Surtos por *Y. enterocolitica* não são comuns, no entanto, alguns merecem destaque devido ao grande número de indivíduos afetados (DRUMMOND et al., 2012). Em 1972, o Japão foi cenário de três grandes surtos em escolas, acometendo 931 crianças com faixa etária de 5 a 12 anos, todos atribuídos ao sorotipo O:3, mas infelizmente não foi identificada a fonte de infecção (SWAMINATHAN et al., 1982).

Nos Estados Unidos, podemos salientar alguns surtos que foram bem documentados no período de 1978 a 1989: em 1978, um surto por *Y. enterocolitica* sorotipo O:8 acometeu 228 indivíduos, entre alunos e funcionários de um colégio em Nova Iorque, cujo veículo foi leite achocolatado; em 1981, outro surto, atribuído ao mesmo sorotipo, acometeu 159 indivíduos em um camping de verão no mesmo estado de Nova Iorque, no qual o veículo foi o leite em pó; em 1981-1982, em Washington, 50 indivíduos foram acometidos pelo mesmo sorotipo, e o tofu e a água que o lavava eram os veículos; em 1982, um surto acometeu 172 indivíduos nos estados de Tennessee, Arkansas e Mississippi, o qual foi causado pelos sorotipos O:13a e O:13b, que tiveram como veículo o leite pasteurizado; e por fim, em 1989, na Geórgia, aonde acometeu 15 crianças que viviam em locais de produção artesanal de produtos cárneos suínos, tendo os sorotipos O:3 (14 isolados) e O:1,2,3 (1 isolado) como os responsáveis por este surto (BOTTONNE, 1997).

Bottone (1983) realizou um estudo, no período de 1974 a 1982, no qual ele conseguiu o isolamento de 56 cepas de *Y. enterocolitica* de pacientes residentes na área da cidade de Nova Iorque. A análise dos isolados revelou que o aumento nos episódios de bacteremia estavam relacionados com cepas dos sorotipos O:3 e O:5,27, sendo o biossorotipo 4/O:3 o mais encontrado, representando 49% (27/56) do total dos isolados. Ainda, o sorotipo O:3 representou 59% (19/32) dos isolados de fezes de pacientes abaixo de um ano de idade. O aparente estabelecimento do sorotipo O:3 na comunidade urbana demonstra a capacidade

crescente deste sorotipo em se espalhar, podendo ser capaz de gerar novos surtos de yersiniose (BOTTONNE, 1983).

Ainda nos EUA, entre os anos de 1996 e 2007, foi realizada uma pesquisa pelo FoodNet, em 7 estados, nos quais foram relatados 1.903 casos relacionados com infecção alimentares por *Yersinia*. Destes, 1.471 casos foram identificados até o nível de espécie, sendo 1.355 (92%) dos casos atribuídos a *Y. enterocolitica*. A incidência anual de infecções por *Y. enterocolitica* segundo o FoodNet é de 3,5 casos por 1 milhão de habitantes, e muitos destes casos, 443 (33%), ocorreram na região sul do estado da Geórgia. A média da idade dos pacientes acometidos por *Y. enterocolitica* foi de 6 anos, sendo bem distribuída entre homens, mulheres, afrodescendente e caucasianos (LONG et al., 2010).

Já na Europa, os países que apresentam alta incidência são a Bélgica (TAUXE et al., 1986), Alemanha (ROSNER et al., 2010) e Suécia (BOQVIST et al., 2009). Todos eles tiveram *Y. enterocolitica* O:3 como principal agente etiológico, os produtos de origem suína como principal veículo e crianças abaixo de 6 anos de idade apresentando maior incidência.

Noruega e Dinamarca também figuram como países onde a *Y. enterocolitica* possui alta relevância em saúde pública, uma vez que ela é a terceira causa mais comum de enterite aguda. No passar de uma década, a Noruega apresentou de 80–150 casos de yersiniose por ano, 1 em cada 10 destes casos foi atribuído ao sorotipo O:9 (GRAHEK-OGDEN et al., 2007). Ainda na Noruega, foram relatados dois surtos causados pelo sorotipo O:9: um em 2006, acometendo 11 indivíduos com dois óbitos, veiculados por produtos de origem suína prontos para o consumo; e outro em 2011 que acometeu 21 indivíduos, tendo como veículo um mix de salada pronta para consumo (GRAHEK-OGDEN et al., 2007; MACDONALD et al., 2012). Já a Dinamarca apresentou 238 casos confirmados de yersiniose no ano de 2009 (EFSA, 2011).

O relatório europeu de zoonoses e surtos de origem alimentar (EFSA) de 2009 reportou um total de 7.595 casos humanos confirmados de yersiniose na Europa naquele ano, demonstrando assim um decréscimo de 8% no total de casos, se compararmos com o ano de 2008 que apresentou 8.346 casos humanos de yersiniose. *Y. enterocolitica* foi a espécie mais reportada em casos humanos representando 93,7% dos isolados, tendo sua prevalência de 4.8% em todas as amostras de carne de suíno analisadas. Ainda, o biotipo 4 sorotipo O:3 é o mais prevalente em infecções humanas, seguido pelo biotipo 2 sorotipo O:9 (EFSA, 2011).

Apesar de todos os surtos relatados até aqui terem sido de origem alimentar, a literatura registra surtos nosocomiais de diarreia incriminando *Y. enterocolitica* (TOIVANEN et al., 1973; BOTTONNE, 1997). Um caso bem documentado, tido como um surto nosocomial, ocorreu na Finlândia e foi publicado em 1973. O surto por *Y. enterocolitica*

envolveu a infecção em seis membros da equipe hospitalar em duas alas do hospital, equipe esta que estava prestando cuidados a uma menina com idade escolar (9 anos). *Y. enterocolitica* sorotipo O:9 foi isolada tanto das fezes da paciente quanto das fezes dos seis membros da equipe que adoeceram. A paciente deu entrada no hospital apresentando um quadro clínico de dor abdominal e diarreia, os casos secundários ocorreram 10 dias após a admissão da paciente zero (TOIVANEN et al., 1973). A rota de transmissão aventada neste relato foi a transmissão pessoa a pessoa. No entanto, esse tipo de transmissão é um tanto quanto questionável, uma vez que para que isso ocorresse a dose infectante teria que ser por volta de 10^9 UFC, logo a transmissão provavelmente deva ter sido a contaminação de uma fonte de consumo comum entre a equipe e a paciente (BOTTONNE, 1997).

1.6 Yersiniose no Brasil

No Brasil, *Y. enterocolitica* apresentou seus primeiros relatos com os isolados suínos e humanos em 1968 (FALCÃO et al., 2006). Desde então, a partir dos vários estudos desenvolvidos em nosso meio, foi evidenciado que *Y. enterocolitica* é uma realidade retratada pelo isolamento a partir de espécimes clínicos humano e animal, alimentos e de meio ambiente (NUNES; RICCIARDI, 1981;1986; NUNES et al. 1984; ASENSI; HOFER, 1986; MENDONÇA et al., 1992; 1995; LÁZARO; HOFER, 1996; FALCÃO et al., 2006; FALCÃO; FALCÃO, 2006; PAIXÃO et al., 2013a, 2013b; RUSAK et al., 2014).

Y. enterocolitica não é tão relatada e estudada no Brasil quanto em outros países, tornando-se difícil se estabelecer o envolvimento desta bactéria como agente etiológico de enfermidades em animais ou no homem, como também se estimar seu impacto nos alimentos (FALCÃO et al., 2006). Tal fato se deve, ou a pequena ocorrência do microrganismo em nosso país, ou a não utilização das técnicas ideais para isolamento e caracterização da bactéria (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

O Brasil não apresenta dados oficiais de ocorrência de yersiniose, e os poucos relatos ficaram restritos aos trabalhos científicos (RUSAK et al., 2014). Aqui, a yersiniose geralmente é relatada em casos isolados, nunca em surtos, relacionados em sua maioria ao quadro clínico de diarreia no homem, representado prevalentemente pelo sorotipo O:3 biotipo 4 (FALCÃO; FALCÃO, 2006). No entanto, salienta-se a detecção de *Y. enterocolitica* em outras manifestações clínicas humanas, tais como: na anemia falciforme, pneumonia, adenopatia, processos cutâneos, artrite e mais raramente na talassemia (FALCÃO; FALCÃO, 2006).

No nosso país, as regiões Sudeste e Sul apresentam o maior número de isolados de *Y. enterocolitica*, com destaque para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, onde predominam os representantes dos biossorotipos patogênicos 4/O:3 e 2/O:5,27, e do biotipo 1A, de fontes humana, animal e ambiental. Em menor escala, os estados de Pernambuco e Bahia também já apresentaram isolados de *Y. enterocolitica* (LÁZARO; HOFER, 1996; FALCÃO et al., 2004, 2006; PAIXÃO et al., 2013b; RUSAK et al., 2014; FRAZÃO; FALCÃO, 2015). Aqui como em outras partes do mundo, estudos de filogenia conseguiram relacionar o suíno como principal reservatório de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica*, atuando como principal elemento na cadeia de transmissão do patógeno ao homem (LÁZARO; HOFER, 1996; PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014).

Por ser apontada como o maior agente causador de yersinioses pelo mundo, *Y. enterocolitica* possui relevância em saúde pública em regiões com um clima mais frio como a Europa, Costa Ocidental da América do Sul, alguns países da Oceania e Canadá (DRUMMOND et al., 2012). É digno de menção que o único site governamental que aborda este microrganismo é o da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - SES/SP, pelo Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE, no manual das doenças transmitidas por alimentos e água, no capítulo que discorre sobre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/>). Tal fato demonstra o caráter emergente da doença e do agente etiológico em saúde pública, inclusive sendo complementado em 2002 com o lançamento de uma cartilha, pelo Centro de vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, denominada Vigilância Ativa das Doenças Transmitidas por Alimentos: normas e instruções (CVE/SES-SP, 2002). O documento teve por objetivos fornecer orientações básicas aos gestores de saúde, equipes de vigilância epidemiológica e outros profissionais de saúde, para a organização do sistema e seu gerenciamento.

1.7 A fisiopatologia da infecção

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

A colonização no trato entérico se inicia pela ingestão de alimentos ou água contaminados. 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. Este 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; GALINDO et al., 2011).

A dose mínima infectante para desencadear a infecção por *Y. enterocolitica* ainda não é conhecida, contudo admite-se que deve exceder a 10^4 UFC. Os primeiros sintomas podem aparecer de 24-48 horas após a ingestão (DRUMMOND et al., 2012).

O grande número de descrições do comportamento de *Y. enterocolitica* em modelo animal contrasta com a escassez de dados sobre a patogenia em humanos. Isso ocorre devido ao risco do desenvolvimento de sequelas auto-imunes, logo a maioria das informações à cerca da patogenia deste microrganismo foi obtida utilizando-se modelo animal e nunca modelo humano, destacando como mais utilizados as matrizes de camundongos e coelhos (FALCÃO; FALCÃO, 2006; ROBINS-BROWNE, 2007).

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 (BOTTONNE, 1997). O tecido linfóide 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 linfóide 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 (ROBINS-BROWNE, 2007). Já *Yersinias* virulentas, que invadem o tecido, atravessam o lumen intestinal, se aderem e penetram na barreira de muco que recobre as células do epitélio da mucosa, preferencialmente se ligam e invadem as células M (grupo especial de células epiteliais foliculo associadas). Essas têm a função de capturar o microrganismo, resultando na multiplicação das bactérias nas placas de Peyer (GRÜTZKAU et al., 1990; DE KONING-WARD et al., 1998; PUJOL; BLISKA, 2005).

Uma vez internalizadas, as bactérias são transportadas através da barreira epitelial e expelidas pelo lado basolateral das células M (FÀBREGA; VILA, 2012). Evidências sugerem que nos passos iniciais da infecção, fagócitos internalizam a bactéria. Este microrganismo internalizado supostamente se replica dentro dos macrófagos e presume-se que ele seja transportado pelos fagócitos migrantes para os linfonodos mesentéricos, resultando em uma

linfadenite mesentérica (PUJOL; BLISKA, 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a; 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 (OELLERICH et al., 2007; FÀBREGA; VILA, 2012) (Figura 1-1).

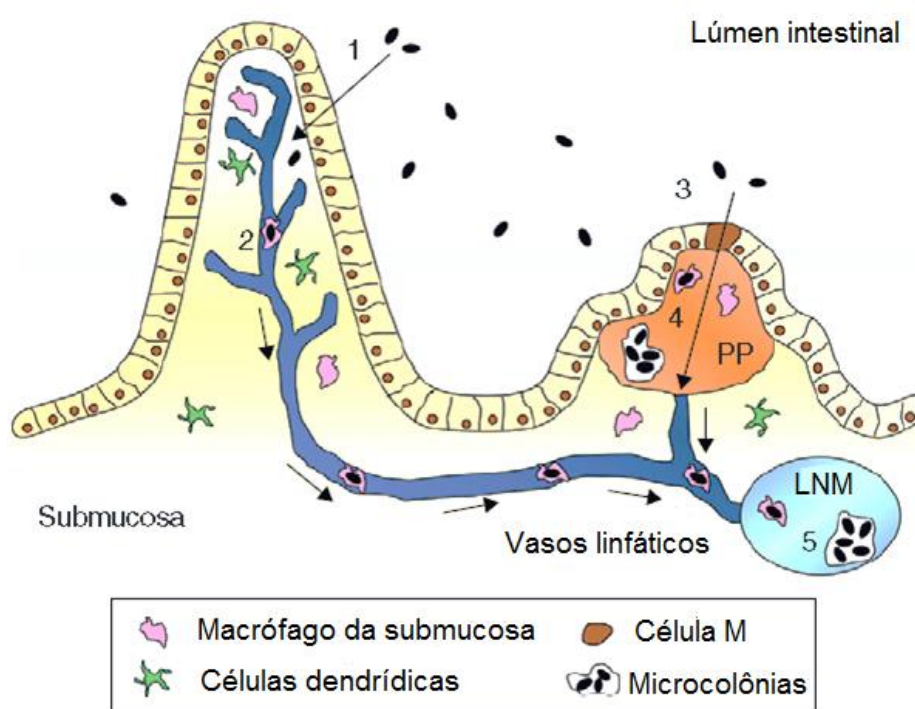


Figura 1-1 - Modelo de patogênese por *Yersinia enterocolitica*. (1) Células de *Yersinia* atravessam o epitélio intestinal pelas células epiteliais em direção à submucosa. (2) Os macrófagos da submucosa fagocitam o patógeno, entram no sistema linfático e vão em direção ao linfonodo mesentérico (LNM). (3) Alternativamente, as células bacterianas podem ser fagocitadas pelas células M. (4) Uma vez nas placas de Peyer (PP) a *Yersinia* forma microcolônias e começa a replicação. (5) Ainda, as células bacterianas localizadas no LNM podem também formar microcolônias o que permite a sua replicação. (adaptado de Fábrega; Vila (2012))

1.8 Mecanismos de patogenicidade cromossomiais

A patogenicidade de *Y. enterocolitica* está relacionada aos fatores de virulência produzidos pelas cepas pertencentes aos biossorotipos patogênicos (BOTTONNE, 2015). Neste aspecto, *Y. enterocolitica* sorotipo O:8, biotipo 1B, subsp. *enterocolitica* é tida como a mais

virulenta de todas, conhecida também como cepa "do novo mundo", devido ao fato de ser primordialmente encontrada nos EUA (BATZILLA et al., 2011a; DRUMMOND et al., 2012; BOTTONE, 2015).

Os fatores de virulência caracterizados em *Y. enterocolitica* encontram-se distribuídos pelo seu cromossomo e por um plasmídio de virulência conhecido como pYV (*plasmid Yersinia Virulence*) (FÀBREGA; VILA, 2012).

A regulação dos fatores de virulência é feita de acordo com a temperatura, permitindo a bactéria dar uma resposta de expressão gênica do processo adaptativo da transição do meio ambiente para um ambiente com condições adversas dentro do hospedeiro humano (FÀBREGA; VILA, 2012). Existem dois sistemas de termoregulação gênica conhecidos em *Yersinia*: RovA, que ativa a expressão da invasina, e YmoA, que age reprimindo a expressão da mesma (ELLISON et al., 2003).

No que tange a invasão e adesão, *Y. enterocolitica* patogênica possui em seu cromossomo o gene *inv* (*invasive gene*), responsável pela produção da invasina, uma proteína de membrana externa. Constitui-se no primeiro fator de invasão das células de mamíferos, recrutada para uma eficiente translocação da bactéria através do epitélio intestinal (RASMUSSEN et al., 1994). A invasina é uma adesina não fimbriar que se liga à integrina $\beta 1$, expressa na superfície apical das células M, facilitando a invasão nas placas de Peyer, quando em conjunto com outros fatores (ISBERG; BARNES, 2001). Outro gene cromossomal que também atua na invasão de células eucariotas é o *ail* (*attachment invasion locus*), expresso a 37°C, sendo responsável pela fixação ao locus de invasão que medeia a invasão celular (MILLER et al., 1990). Ele codifica uma proteína de membrana externa (Ail), que confere a capacidade de resistir à ação bactericida do complemento (PIERSON; FALKOW, 1993). Em termos de adesão, *Y. enterocolitica* conta ainda com o locus *myf* (*mucoïd Yersinia fator*), constituído por cinco genes *myfA*, *myfB*, *myfC*, *myfE* e *myfF*, ativos a 37°C e em pH 6, sendo responsáveis por transcrever proteínas que formam a estrutura fibrilar, além de chaperonas que agem na montagem da estrutura (IRIARTE; CORNELIS, 1995; MIKULA et al., 2012). No entanto, o *operon myf* em *Y. enterocolitica* não é capaz de mediar a hemaglutinação, e seu papel como adesina na patogênese não está totalmente esclarecido (FÀBREGA; VILA, 2012; MIKULA et al., 2012).

O flagelo atua, em *Y. enterocolitica*, tanto no campo da motilidade como no sistema secretor e na formação de biofilme, sendo muito importante no início do processo de invasão celular (KIM et al., 2008; FÀBREGA; VILA, 2012). Entre as enterobactérias, a regulação dos genes que estão envolvidos na biossíntese do flagelo e quimiotaxia ocorre em coordenação com a montagem do flagelo e aos estímulos ambientais (YOUNG et al., 1999).

A expressão destes genes obedece a uma hierarquia que foi organizada dentro de três classes: I, II e III. A classe I consiste dos genes *flhD* e *flhC*, os quais formam um *operon* e são o topo da hierarquia, pois controlam a expressão de todos os outros genes flagelares. A classe II é composta por genes que vão transcrever proteínas da parte estrutural do flagelo e proteínas acessórias necessárias para montagem do corpo basal da estrutura flagelar e, acrescido de dois genes que transcrevem as proteínas regulatórias de FlgM e do promotor σ^{28} . Por fim a classe III, albergando os genes dependentes do promotor σ^{28} , assim como, os genes responsáveis por transcrever as proteínas que são requeridas para a maturação flagelar e sistema quimiossensorial (YOUNG et al., 1999).

Y. enterocolitica possui três sistemas de secreção do tipo III (T3SS), sendo um plasmidial, que será discutido adiante, e dois adicionais cromossômiais: o flagelar T3SS e o Ysa (*Yersinia secretion apparatus*) T3SS (HALLER et al., 2000; GALINDO et al., 2011). O Ysa T3SS tem sua expressão ótima na fase estacionária de crescimento, em alta concentração de sal e a 26°C, tendo importância na virulência, pois atua na colonização do intestino delgado (HALLER et al., 2000; GALINDO et al., 2011; BENT et al., 2013). São conhecidas 15 proteínas efetoras de Ysa (Ysps) com função moduladora da resposta imune do hospedeiro (GALINDO et al., 2011). Já o T3SS flagelar tem função na biogênese do flagelo assim como na patogênese do secretar YplA (*Yersinia phospholipase A*), proteína requerida para colonização das placas de Peyer e dos nódulos linfóides mesentéricos, provocando uma resposta inflamatória nesses tecidos (SCHMIEL et al., 2000).

Na produção de toxinas, o gene *yst* (*yersinia stable toxin*) é responsável pela formação de uma enterotoxina termoestável, de baixo peso molecular, que causa diarreia devido à ativação de uma forma particular de guanilato ciclase, aumentando os níveis de GMPc no intestino (REVELL; MILLER, 2001). Este gene ainda apresenta dois subtipos: *ystA* e *ystB*, sendo o primeiro predominante nos sorotipos patogênicos e o segundo nos representantes do biotipo 1A, não patogênico (RAMAMURTHY et al., 1997). 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 de *Escherichia coli* (REVELL; MILLER, 2001). Entretanto, o gene *yst* é encontrado somente em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica*, fato que o torna um importante marcador de cepas potencialmente virulentas (IBRAHIM et al., 1997). Ainda, os genes *yaxA* e *yaxB*, homólogos aos genes *xaxA* e *xaxB*, de *Xenorhabdus nematophila*, são responsáveis pela transcrição de duas proteínas YaxA e YaxB, com atividade citotóxica em células humanas e murinas quando em cultura. Sua ação tóxica se dá pela formação de poros na membrana plasmática da célula alvo, causando lise osmótica. As duas proteínas têm papel

importante na patogenicidade de *Y. enterocolita*, uma vez que a falta dos dois genes acarreta uma alteração na patologia e baixo nível de colonização bacteriana do baço (WAGNER et al., 2013).

O lipopolissacarídeo (LPS) é o maior componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, e muitas evidências apontam que o antígeno O tem papel importante na relação bactéria-hospedeiro (BENGOECHEA et al., 2004). Na verdade, o antígeno O é essencial para a expressão total da virulência em *Y. enterocolitica* dos sorotipos O:3 e O:8 (BENGOECHEA et al., 2004), pois diversos estudos demonstraram que esse antígeno está envolvido nos processos de invasão e colonização. Amostras mutantes com deficiência na expressão do antígeno O, foram ineficientes na colonização das placas de *Peyer*, além de não conseguirem se multiplicar no baço, fígado e linfonodos mesentéricos, quando comparadas às amostras selvagens. Tais amostras mutantes demonstraram alterações na expressão ou funcionalidade dos fatores de virulência da membrana externa como: *YadA* (*Yersinia adhesin A*); adesina plasmidial, tem sua função atenuada; a proteína *Ail* não é expressa e a invasina *inv* tem expressão reduzida (BENGOECHEA et al., 2004; FÀBREGA; VILA, 2012).

Cepas de *Y. enterocolitica*, do biotipo 1B, possuem uma ilha da patogenicidade cromossomal conhecida como HPI (*High Pathogenicity Island*), que confere um aumento na virulência. A maioria dos genes localizados na ilha estão envolvidos na biossíntese, transporte e regulação do sideróforo yersiniabactin. A HPI também é conhecida como ilha de captura de ferro (CARNIEL et al., 1996; PAAUW et al., 2009). O *locus* envolvido é composto por 11 genes organizados em quatro *operons* (*fyuA*, *irp2*, *ybtA* e *ybtP*), que podem ser divididos em três grupos funcionais: síntese do yersiniabactin, transporte para dentro da parede celular bacteriana (receptores de membrana externa e transportadores) e regulação (CARNIEL, 2001). O aumento na virulência devido à presença da HPI pode ser explicado pelo aumento da utilização do ferro do meio pela bactéria, favorecendo o crescimento bacteriano e limitando a disponibilidade de ferro para as células do sistema imune inato, que utilizam o ferro para catalisar a reação de Haber-Weiss, que produz radicais de hidroxila (PAAUW et al., 2009). Yersiniabactin reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células efetoras do sistema imune como: leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, causando à redução na mortandade das células bacterianas (PAAUW et al., 2009; DRUMMOND et al., 2012).

1.9 Mecanismos de patogenicidade plamidiaais

O outro fator de patogenicidade em *Y. enterocolitica* é a presença do plasmídeo pYV, de cerca de 64-75-kb (Figura 1-2) indispensável à virulência e, usualmente, expresso a 37°C, temperatura na qual o plasmídeo confere “dependência ao cálcio”, que desaparece quando a bactéria é cultivada em temperatura inferior a 37°C. O fenótipo conhecido como “dependência ao cálcio” ou “resposta a baixa concentração de cálcio” se manifesta quando a cepa portadora de pYV é cultivada em meio com baixa concentração de Ca²⁺ (ROBINS-BROWNE, 2007). Em síntese, em função da temperatura, alguns os fatores de virulência cromossomiais são expressos em torno de 25°C (invasina), enquanto os plamidiaais em 37°C (GEMSKI et al., 1980; BOTTONE, 1997; FALCÃO; FALCÃO, 2006; FÀBREGA; VILA, 2012).

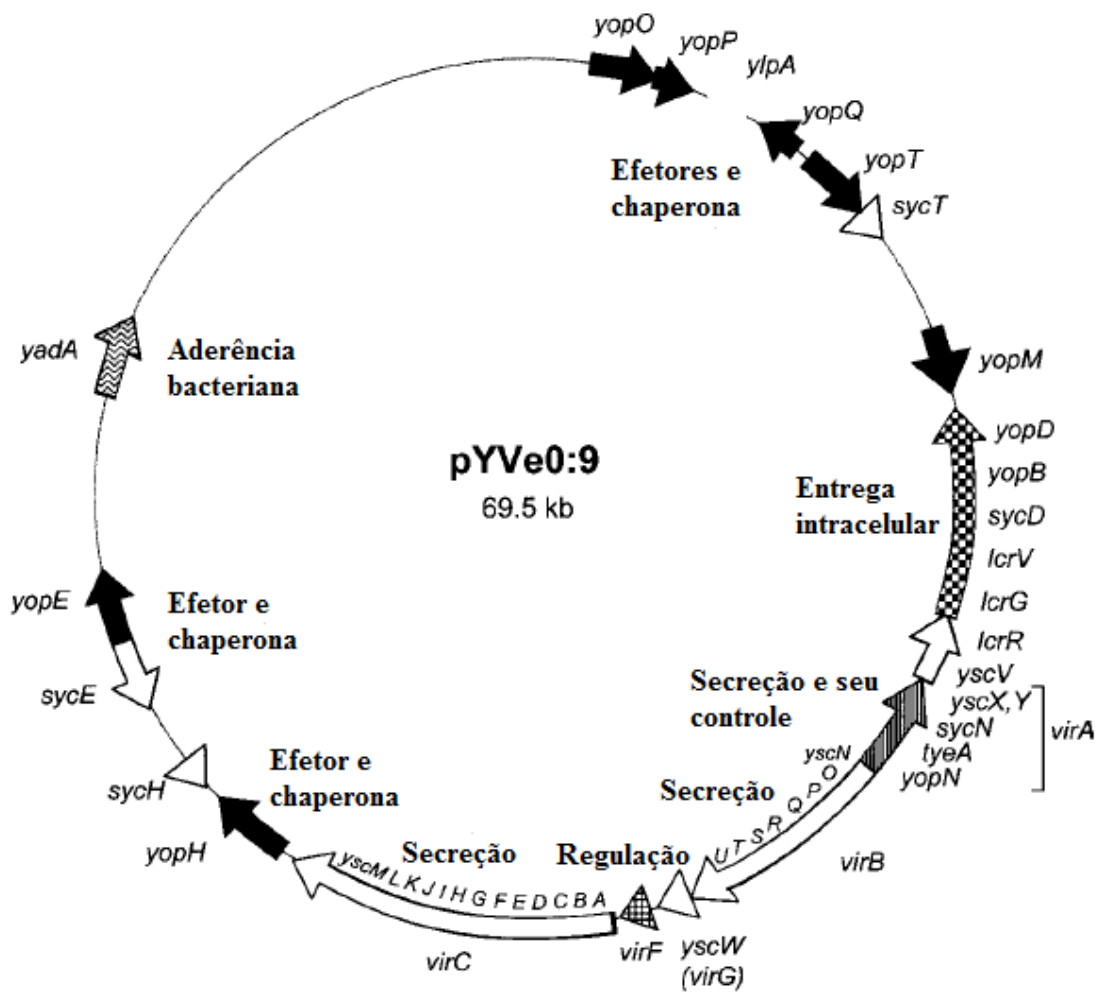


Figura 1-2 - Mapa genético do plasmídeo de virulência (pYV) de *Y. enterocolitica* sorotipo O:9, demonstrando o local, a direção de transcrição e a função de cada gene. (adaptado de Robins-Brown (2007)).

A presença do plasmídeo codifica uma matriz de proteínas que, de modo gradativo, orienta o patógeno invasor a ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro para se estabelecer dentro de seu nicho ecológico extracelular ou de macrófagos (BOTTONNE, 1997). Os genes plasmidiais codificam proteínas para a formação do sistema de secreção do tipo III chamado de Ysc T3SS, formado por uma estrutura à semelhança de uma agulha hipodérmica (*injectosome*) e o translocon, que é capaz de produzir um poro através da membrana plasmática da célula do hospedeiro (ATKINSON; WILLIAMS, 2016).

De acordo com uma combinação de reguladores e chaperonas, a função principal do Ysc T3SS é injetar proteínas efetoras, denominadas Yops (*Yersinia outer proteins*), direto no citosol da célula do hospedeiro, onde vão atuar subvertendo várias vias de sinalização celular, sendo como um gatilho para uma cadeia de reações metabólicas pré-programadas que resultarão em apoptose (TROSKEY et al., 2008; ATKINSON; WILLIAMS, 2016). As Yops hoje conhecidas em *Y. enterocolitica* são: YopB, YopD, LcrV, YopQ, YopE, YopH, YopM, YopT, YopO, YopP e YopN (CORNELIS, 2002a), sendo que os genes que codificam tais proteínas se distribuem pelo plasmídeo, em uma região de 20 kb, denominada cálcio-dependente. É uma região contendo ao menos quatro *loci* conhecidos como *virA*, *virB*, *virC* e *virF*, que são responsáveis pelo controle da resposta ao cálcio e da produção das Yops (MICHIELS et al., 1991). O gene *virF* codifica ainda uma proteína denominada VirF, que é o principal elemento regulador de todo este mecanismo (CORNELIS et al., 1998). Três Yops, YopB, YopD e LcrV, são responsáveis pela translocação das Yops efetoras através da membrana plasmática da célula alvo, formando uma espécie de poro na membrana (CORNELIS, 2002a). A secreção de algumas Yops requer a presença de pequenas chaperonas citosólicas, que se ligam as respectivas Yops, e pertencem à família de proteínas Syc: SycE (para YopE), SycH (para YopH), SycT (para YopT), SycN (para YopN) e SycD (para YopB e YopD). A falta destas chaperonas faz com que a secreção das Yops seja gravemente reduzida ou interrompida (CORNELIS, 2002b).

O complexo Ysc T3SS em conjunto com as Yops neutraliza diversos mecanismos chave de defesa da imunidade inata dos fagócitos, além de diminuir o processo inflamatório (FÀBREGA; VILA, 2012). No que tange as Yops efetoras, seis foram identificadas: YopH, YopE, YopT, YpkA/YopO, YopP/YopJ e YopM, sendo que quatro (YopH, YopE, YopT e YpkA/YopO) inibem a dinâmica do citoesqueleto, mediam a evasão do sistema imune devido a interferência nos sinais da via de transdução do hospedeiro, contribuindo para a resistência da *Yersinia* patogênica à fagocitose por macrófagos e neutrófilos (CORNELIS, 2002a; GALINDO et al., 2011; FÀBREGA; VILA, 2012).

YopH é uma poderosa tirosina fosfatase atuando como antagonista em várias vias de sinalização importantes da imunidade inata e adaptativa, reduzindo a internalização e a morte das células bacterianas por neutrófilos e macrófagos, neutralizando respostas associadas à fagocitose como a queima oxidativa e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (CORNELIS, 2002a, 2002b; FÀBREGA; VILA, 2012).

YopE é uma proteína funcional que mimetiza uma proteína ativadora de GTPase (GAPs) eucariota, e despolimeriza o filamento de actina do citoesqueleto, causando a inibição da fagocitose por macrófagos (EVDOKIMOV et al., 2002; AILI et al., 2006; ATKINSON; WILLIAMS, 2016). Essa proteína ainda inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias de células epiteliais infectadas, quando em conjunto com outras Yops (IRIARTE; CORNELIS, 1998).

YopT demonstra o mesmo efeito da YopE em culturas de células: a despolimerização do filamento de actina do citoesqueleto e a inibição da fagocitose (IRIARTE; CORNELIS, 1998). YopT suprime a sinalização mediada por RhoA clivando a Rho GTPases pós-translacionalmente modificada, impedindo a formação da estrutura fagocítica para internalização da bactéria, e inibe a montagem do complexo de adesão focal requerido para o desenvolvimento de pseudópodes e migração do macrófago (SCHMIDT, 2011; ATKINSON; WILLIAMS, 2016).

YopP e YopM promovem a sobrevivência intracelular da *Yersinia* neutralizando a produção de citocinas pró-inflamatórias, bloqueando a ação da célula em responder à infecção (BOLAND; CORNELIS, 1998; FÀBREGA; VILA, 2012). A morte da célula hospedeira é mediada por YopP/J, uma serina O-Acetiltransferase, que induz a apoptose de fagócitos devido à modulação das ações do LPS (GALINDO et al., 2011). Ela suprime a produção do TNF- α pelos macrófagos e da IL-8 por células endoteliais e epiteliais, levando a uma redução do recrutamento dos neutrófilos para a área de infecção (BOLAND; CORNELIS, 1998; GALINDO et al., 2011). YopM ainda possui um papel enigmático quanto a sua função, mas trata-se de uma proteína rica em repetições de leucina, que migra para o núcleo da célula alvo e pode afetar a transcrição de genes (CORNELIS, 2002a). No entanto, já foi demonstrado que ela interage com as quinases citoplasmáticas e pode estar envolvida na redução dos níveis de IL-10 e IL-18 (CORNELIS, 2002b; VIBOUD; BLISKA, 2005).

Por último a YopO/pkA (*Yersinia protein kinase A*), que se associa com as proteínas da família RhoA, inibe a fagocitose por se ligar e fosforilar à actina que é usada pela *Y. enterocolitica* como uma isca para titular os reguladores da célula hospedeira responsáveis pela polimerização da actina (NAVARRO et al., 2007; GROVES et al., 2010; LEE et al., 2015b). Desta forma, ela modula a dinâmica do citoesqueleto (CORNELIS, 2002a). A

combinação de todas estas proteínas confere a habilidade de se aderir e invadir à célula hospedeira, ou ao menos se ligar a ela de forma suficiente para garantir a entrega das Yops através do T3SS (ATKINSON; WILLIAMS, 2016).

Além das Yops, o plasmídeo codifica também outras duas proteínas de membrana externa: uma adesina, denominada YadA e uma lipoproteína denominada YlpA (CHINA et al., 1990; HEISE; DERSCH, 2006). Antes de conseguir transpassar a barreira do epitélio intestinal, a adesina mais expressa é a YadA, responsável pelo contato entre *Yersinia* e as células da submucosa (MÜHLENKAMP et al., 2015). *Yersinia adhesion A protein* (YadA) ainda media a aderência ao muco e células epiteliais que, em conjunto com a invasina, promovem a invasão da célula hospedeira. Trata-se de uma proteína de superfície, não fimbrial, membro da família das adesinas autotransportadoras triméricas, expressa a 37°C, que confere a habilidade de se aderir a matriz proteica extracelular (GALINDO et al., 2011; MIKULA et al., 2012). É uma proteína multifuncional, no que tange a adesão, agindo como um sistema de ancoragem, permitindo que o *injectosome* do T3SS entre em contato com a membrana da célula alvo e possa entregar as Yops efetoras (ATKINSON; WILLIAMS, 2016). YadA provoca uma resposta inflamatória nas células epiteliais induzindo MAP Quinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos) dependente da produção de IL-8 e contribuindo para a cascata inflamatória intestinal resultante (EITEL et al., 2005). As interações da YadA com o colágeno têm sido apontadas como responsáveis por casos de yersiniose crônica, como o desenvolvimento de artrite reativa (EITEL et al., 2005; GALINDO et al., 2011). Ela ainda media a auto aglutinação bactéria-bactéria, desde que a cabeça do domínio tenha afinidade por ele mesmo (HOICZYK et al., 2000). A auto-afinidade promove o desenvolvimento de forma muito densa, de microcolônias que podem desencadear uma atividade antifagocitária em *Y. enterocolitica*. E por último, ela tem um papel importante na resistência à ação do complemento (BIEDZKA-SAREK et al., 2008; KIRJAVAINEN et al., 2008; ATKINSON; WILLIAMS, 2016).

Tanto células eucariontes como procariontes podem produzir fosfolipases, que é um grupo diverso de enzimas com a capacidade de clivar fosfolipídeos. Além disso, as fosfolipases de origem bacteriana vêm sendo consideradas, há algum tempo, como um potencial fator de virulência (MEYSICK et al., 2009). Contudo, a origem e expressão de YlpA ainda é um tema dúbio, pois China *et al.* (1990) sustentam a hipótese de que essa proteína é de origem plasmidial, controlada pelo gene *virF*, sendo somente expressa a 37°C quando na ausência de íons de Ca^{2+} , no entanto, Young e Young (2002) sustentam a hipótese de que o locus *yplA* pertence ao *regulon* flagelar, sendo sua expressão e secreção controlados pelos genes *flhDC* e *fliA*, e ainda demonstraram também a produção YlpA a 26°C em coordenação

com outros genes flagelares. Apesar desta discordância, estudos sugerem que o gene *yplA* é conservado dentro do gênero *Yersinia* (CHINA et al., 1990; YOUNG; YOUNG, 2002). Por fim, a fosfolipase YplA tem sido extensivamente caracterizada em *Y. enterocolitica*, como um fator de virulência que promove a colonização bacteriana e aumenta a resposta inflamatória (MEYSICK et al., 2009).

1.10 Diagnóstico laboratorial

1.10.1 Processo clássico

A identificação clínica de *Y. enterocolitica* se dá, na maioria das vezes, a partir da cultura de amostras de fezes no Ágar MacConkey (ou em outros meios seletivos expostos anteriormente) bem como, no Ágar CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina), conhecido como meio seletivo para *Yersinia* (BOTTONI, 1997). No entanto, devido ao baixo número de células de *Yersinia* patogênica em hospedeiros saudáveis e ao grande número de microrganismos presentes na microbiota associada a amostras de alimentos, fezes e ambiente, o isolamento direto em placa, mesmo em meios seletivos, raramente é bem sucedido (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Logo, com o intuito de aumentar o número de células de *Yersinia* nestas amostras, uma etapa de enriquecimento em meio líquido previamente ao isolamento em meio sólido é extremamente recomendado (DE BOER, 1992).

A psicofilia é uma característica que não é usualmente encontrada dentro da família *Enterobacteriaceae*. Entretanto, o enriquecimento em diferentes soluções a 4° C, e por períodos prolongados, tem sido utilizado para favorecer o isolamento de cepas de *Yersinia* (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). O enriquecimento a frio, por um período de 21 dias, em salina fosfatada (PBS) ou em salina fosfatada suplementada com sorbitol ou sais biliares (PSB) tem sido largamente utilizado em amostras clínicas, de alimentos e de ambiente (PEIXOTTO et al., 1979; DE BOER, 1992; LOGUE et al., 1996; FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003).

Os crescimentos semeados nos meios seletivos são incubados a 37°C por 24 horas, e a identificação das colônias é feita de acordo com as características macroscópicas apresentadas. *Y. enterocolitica* age sobre a lactose (fermentação lenta) contida nos meios, embora seu crescimento seja mais lento quando comparado com o das outras enterobactérias normalmente presentes em amostras fecais. Com isso, as colônias muito pequenas e sem cor (devido à fermentação lenta da lactose) que crescem no Ágar MacConkey fazem com que a identificação desta bactéria seja uma tarefa difícil quando comparada com as colônias de

crescimento rápido da microflora associada (BOTTONNE, 1997; FÀBREGA; VILA, 2012). Conseqüentemente, o uso do Ágar seletivo para *Yersinia* (CIN) se faz necessário, uma vez que sua formulação contém substâncias que inibem o crescimento de diversos representantes da flora entérica, concomitantemente com o favorecimento do crescimento do patógeno. Neste meio, *Y. enterocolitica* apresenta uma colônia com uma fina camada translúcida que circula a borda contrastando com o centro em vermelho escuro, configuração conhecida como “bull eye”, resultado da fermentação do manitol (SCHIEMANN, 1979).

Em seqüência, os isolados suspeitos são analisados quanto seu perfil bioquímico. *Y. enterocolitica* apresenta fermentação anaerogênica de glicose (sem produção de gás) e de outros carboidratos, produção de urease, mobilidade a 25°C, mas não a 37°C e desprovida da oxidase. Os meios de triagem como Ágar Kligler-Ferro (KIA) ou Ágar Triplice Açúcar Ferro (TSI), são utilizados no diagnóstico presuntivo das enterobactérias (BOTTONNE, 1997).

Os isolados ainda são subdivididos por biogrupos, como o observado anteriormente, tendo a classificação propostas por Wauters (1981) como vigente nos estudos desta espécie (BOTTONNE, 1997).

A caracterização antigênica de *Y. enterocolitica* é realizada a partir da técnica da sorogluinação rápida em lâmina, utilizando-se os antissoros específicos para cada sorogrupo. É baseada no antígeno somático do LPS e coincide com a biotipificação, subdividindo a espécie de acordo com o seu potencial patogênico (ROBINS-BROWNE, 2007). Em relação à distribuição geográfica dos sorotipos, esta metodologia é particularmente importante em regiões como a Europa e Japão, nas quais detectamos com frequência sorotipos específicos como O:3 e O:9 respectivamente (BOTTONNE, 1997; FÀBREGA; VILA, 2012).

Quando o sistema de antissoros não está disponível, alguns testes fenotípicos podem ser utilizados para avaliar se a amostra é ou não patogênica. Todos estes testes são baseados nas características fenotípicas relacionadas à expressão do plasmídio de virulência, sendo os principais: a autoaglutinação a 37°C, crescimento dependente de cálcio a 37°C, captação do vermelho de congo e do cristal violeta e a produção da pirazinamidase (SKURNIK; BOLIN; HEIKKINEN, 1984; BHADURI et al., 1987; RILEY; TOMA, 1989; BHADURI et al., 1990; FARMER et al., 1992).

Atualmente, são encontrados no mercado testes de identificação rápidos que apresentam alternativas viáveis aos tradicionais testes bioquímicos. Como exemplo, podemos citar o sistema API 20E, largamente utilizado para uma identificação presuntiva de isolados de *Yersinia*. Trata-se de um teste aprimorado para identificação de *Y. enterocolitica*, apresentando uma taxa de positividade e identificação na ordem de 93% quando incubado a

28°C (SHARMA et al., 1990; NEUBAUER et al., 1998; FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003).

1.10.2 Diagnóstico molecular

O isolamento de *Y. enterocolitica* de amostras clínicas, de alimentos e ambiental é um processo com inúmeras dificuldades (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Os métodos convencionais baseados em cultura apresentam várias limitações como: longo período de incubação, atingindo até quatro semanas; em alguns casos, identificação bioquímica inconclusiva entre as espécies; falta de identificação entre cepas patogênicas ou não e, no caso de amostras isoladas de fezes, o grande número de colônias de espécies entéricas que competem com o baixo número de colônias de *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003; COCOLIN; COMI, 2005). Além disso, *Y. enterocolitica* junto com *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae*, fazem parte de um grupo de bactérias que conseguem permanecer em um meio de forma viável, mas não cultivável (ALEXANDRINO et al., 2004).

Diante do exposto, estudos foram realizados com o intuito de desenvolver métodos confiáveis e rápidos para detecção de *Y. enterocolitica* patogênica, direto da amostra. No campo do diagnóstico molecular, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi o método para detecção de ácido nucleico mais aceito, figurando hoje como o mais utilizado, ultrapassando os métodos de hibridização. É possível detectar a *Y. enterocolitica* em uma amostra de forma rápida, com grande especificidade e sensibilidade (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a).

A partir daí, como consequência, vários ensaios foram desenvolvidos para detecção de *Y. enterocolitica* de amostras clínicas, de alimentos e de ambiente, tendo como alvo o pYV (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Devido à possibilidade de perda do plasmídeo, alvos cromossômicos começaram a ser utilizados, como alguns genes de virulência no caso os genes *ail*, *inv* e *yst* (THOERNER et al., 2003; BHADURI et al., 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; ZHENG et al., 2008; TADESSE et al., 2013).

Contudo, o método de PCR para detecção de *Y. enterocolitica* com outros alvos que não os genes de virulência começaram a ser utilizados, como a região do gene 16S RNAr. Ainda o gene *tufA* (fator de alongamento Tu) e o gene *rfbC*, os quais são específicos para o gênero *Yersinia* e para o sorotipo O:3, respectivamente (WEYNANTS et al., 1996; PARADIS et al., 2005; ISABEL et al., 2008).

Nos últimos anos, a técnica convencional da PCR evoluiu para o *Real-Time* PCR, facilitada pela comercialização de kits para realizá-la, resultando no reconhecimento desta tecnologia como uma excelente ferramenta para o diagnóstico molecular. Comparada à PCR convencional, esta nova é facilitada pela automação, informatização e quantificação de ácidos nucleicos (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a).

Atualmente, os ensaios de *Real-Time* PCR mais populares são as abordagens “*Taqman*” e “*SYBRGreen*”. O primeiro baseia-se na atividade de exonuclease 5’-3’ da *Taq* DNA polimerase em sondas marcadas com corantes fluorescentes. A segunda está fundamentada na ligação dos fluoróforos presentes no SYBR Green à dupla fita de DNA formada e desta forma, emitindo a fluorescência. Embora os dois sistemas sejam potencialmente rápidos e sensíveis, seus princípios de detecção e otimização são diferentes, fato que influencia no preço final de cada ensaio (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Diversos ensaios de *Real-Time* PCR para uma detecção quantitativa de *Y. enterocolitica*, utilizando os dois sistemas de detecção (*Taqman* e *SYBRGreen*), foram publicados recentemente (WOLFFS et al., 2004; WOLFFS et al., 2005; THISTED LAMBERTZ et al., 2008; NAJDENSKI et al., 2012; WANG et al., 2014).

Em decorrência dos problemas advindos do sistema de identificação bioquímico não garantir um reconhecimento confiável ao nível de espécie, o método da PCR começou a ser utilizado em conjunto com o sequenciamento (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Neubauer e colaboradores (2000) descreveram uma metodologia na qual utilizaram a PCR, tendo como alvo o gene 16S RNAr, combinado com o sequenciamento. Numa análise de 269 isolados de 10 espécies dentro do gênero *Yersinia*, os autores identificaram 20 sequências diferentes dentro da região do gene 16S RNAr, com isso, conseguiram distinguir cepas de *Y. enterocolitica* das outras espécies (NEUBAUER et al., 2000b).

Ainda, a técnica do minisequenciamento (*Minisequencing*) está sendo empregada para uma rápida detecção e identificação de *Yersinia* (DALMASSO et al., 2014). Esta técnica é baseada na análise simultânea de várias SNPs (Polimorfismo de base única) numa reação com primers multiplex de extensão (PER) em conjunto com uma análise genética dos fragmentos sequenciados (PASTINEN et al., 1997; QUINTÁNS et al., 2004).

Atualmente, a espectrometria de massa (MALDI-TOF) vem sendo utilizada de forma direta na identificação bacteriana, fazendo uma análise através dos perfis proteicos específicos. A técnica demonstra ser uma ferramenta rápida e acurada para o propósito. Deste modo, vem substituindo à clássica identificação bioquímica e fenotípica em um número crescente de laboratórios clínicos de microbiologia (SENG et al., 2009; BIZZINI et al., 2010).

Por fim, o sequenciamento de nova geração (NGS) começa a se tornar disponível como uma ferramenta de rotina nos laboratórios clínicos. Vários estudos publicados demonstraram a eficácia do sequenciamento de genoma total (*Whole genome sequencing* – WGS) para detecção e identificação de patógeno direto no espécime clínico. A técnica tem como pontos de realce a velocidade e a precisão nos resultados, embora, tendo como fator limitante os custos elevados para a realização. Sem dúvida, não se pode negar que a técnica tem potencial para mudar a forma no diagnóstico laboratorial no campo da microbiologia clínica, em um futuro próximo (FOURNIER et al., 2014; HASMAN et al., 2014).

1.11 Resistência aos antimicrobianos e tratamento

A resistência aos antimicrobianos em amostras de origem humana de *Y. enterocolitica* é baixa, no entanto, cepas multirresistentes já foram reportadas (BONKE et al., 2011). Segundo dados do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) *Y. enterocolitica* é intrinsecamente resistente a ampicilina, ticarcilina, amoxicilina-clavulanato, cefazolina, cefalotina, cefamandol e cefoxitina (FRAZÃO et al., 2017). Contudo, apresenta susceptibilidade *in vitro* a uma gama de antibióticos compreendidos por cefalosporinas de terceira geração, cefamicinas, aminoglicosídeos e ao trimetoprim-sulfametoxazol (FALCÃO; FALCÃO, 2006; FALCÃO et al., 2006).

Já foram descritas cepas com resistência a alguns antibióticos β -lactâmicos como: ampicilina e carbenicilina (FALCÃO; FALCÃO, 2006; BAUMGARTNER et al., 2007). A 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* (PHAM et al., 1995; BONKE et al., 2011). Além da resistência aos antimicrobianos supracitados, já foram encontradas cepas de *Y. 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).

No Brasil, os estudos a respeito da resistência aos antimicrobianos ainda são raros, no entanto, já foram encontradas cepas resistentes a cefalosporina, sulfonamida, tetraciclina,

sulfametoxazol-trimetoprim e amicacina. Ainda, já tiveram relatos de cepas multirresistentes expressando resistência até as fluoroquinolona (FALCÃO et al., 2006; FALCÃO; FALCÃO, 2006; RUSAK et al., 2014; FRAZÃO et al., 2017). Entretanto, a grande maioria das cepas de *Y. enterocolitica* analisadas por aqui permanecem susceptíveis aos antibióticos utilizados no tratamento de gastroenterites, doenças extra-intestinais e infecções hospitalares (FRAZÃO et al., 2017).

Grande parte dos casos clínicos de *Y. enterocolitica* resultam numa gastroenterite autolimitada na qual não é necessária a utilização de antibioticoterapia (BONKE et al., 2011). Quando a terapêutica é necessária, 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).

1.12 Genotipagem por “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST)

Diversas técnicas moleculares, para tipagem epidemiológica, vêm sendo utilizadas nas análises de surtos (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006b). 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 rastrear a origem de um surto (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a).

Devido ao fato da genotipagem em *Y. enterocolitica* ter obtido um grande avanço nas últimas décadas, vários métodos baseados no DNA são utilizados para caracterização da bactéria. Atualmente, as técnicas moleculares mais utilizadas para tipagem compreendem: a análise de DNA plasmidial usando endonuclease de restrição (*Restriction Enzyme Analysis of Plasmids* - REAP), análise de DNA cromossomal usando endonuclease de restrição (*Restriction Enzyme Analysis of Chromosomes* - REAC), amplificação aleatória do DNA polimórfico (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - RAPD), ribotipagem (*Ribotyping*), Eletroforese de enzimas *multilocus* (*multilocus enzyme electrophoresis* - MLEE), análise em *multilocus* de repetições em *tandem* de número variável (*multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* – MLVA), eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) e tipagem de sequências *Multilocus* (*Multilocus sequence typing* -

MLST) (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a; BASTARDO; RAVELO; ROMALDE, 2012; VIRTANEN et al., 2013). Destes, os dois últimos são considerados o padrão ouro em termos de técnicas moleculares de tipagem de microrganismos (JOHNSON et al., 2007; LARSEN et al., 2012).

O princípio que norteia o esquema do MLST é baseado na identificação de sequências de nucleotídeos, de aproximadamente 400 a 500 pb, em múltiplos genes bem conservados (*housekeeping genes*) no genoma bacteriano. Estas sequências únicas (alelos) recebem um número aleatório, e a combinação desses alelos em cada *locus* (perfil alélico) especifica o *sequence type* (ST). Tradicionalmente, a técnica do MLST inicia com uma etapa de amplificação por PCR utilizando os iniciadores específicos para cada *locus* do esquema de MLST, seguida pelo sequenciamento de Sanger (LARSEN et al., 2012).

No gênero *Yersinia*, o MLST vem sendo empregado com sucesso na sua tipagem exemplificando-se: o estudo de cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de javalis na Alemanha, detectando-se com maior frequência os representantes do biótipo 1A, além de descobrir 17 STs novos (VON ALTROCK et al., 2015). Ainda, no complexo *Yersinia pseudotuberculosis*, o MLST em combinação com as características fenotípicas e genotípicas indicaram uma terceira população de bactérias dentro deste complexo, o que resultou na designação de uma nova espécie dentro do gênero, denominada *Yersinia wautersii* (SAVIN et al., 2014).

Em 2015, Hall e colaboradores sequenciaram 241 cepas contendo todos os representantes de espécies conhecidas dentro do gênero *Yersinia* e desenvolveram um esquema de MLST para este microrganismo. Este esquema consegue identificar cepas de *Yersinia* na esfera de espécie, com uma resolução igual ao do WGS. O processo foi validado pela análise de 386 cepas de referência de coleções de culturas de laboratórios de toda a Europa, sendo eleito para realização desta investigação.

1.13 Sequenciamento de nova geração - *Next-Generation Sequencing* (NGS)

O sequenciamento de genoma bacteriano teve seu início há aproximadamente 22 anos. Durante o período, a poderosa combinação entre o sequenciamento genômico e análise de bioinformática evoluiu o nosso entendimento de como uma bactéria funciona, como se envolve e interage com outras, com seus hospedeiros e com o ambiente (LOMAN; PALLEN, 2015).

Do início dos anos 90, passando pelo presente e olhando para o futuro, a história do sequenciamento de genoma passou por três principais revoluções tecnológicas: *whole-genome*

shotgun sequencing, *high-throughput sequencing* e *single-molecule long-read sequencing* (LOMAN; PALLEN, 2015).

A técnica do *whole-genome shotgun sequencing* (*Sanger shotgun sequencing*) é baseada no sequenciamento por síntese. As sequências de alto peso molecular das cadeias de DNA são cortadas em fragmentos aleatórios, são selecionados fragmentos de 2 a 150 kb e estes são clonados num vetor apropriado (amplificação dos *templates in vivo*). Resumidamente, os clones são sequenciados produzindo duas sequências curtas. Cada sequência é chamada de *end-read* ou *read* e duas *reads* do mesmo clone são chamadas de *mate pairs*. Após o sequenciamento, a sequência original é reconstruída a partir das *reads* com programas de montagem de genoma (ANDERSON, 1981; FLEISCHMANN et al., 1995).

O método de *High-throughput* ou *next-generation sequencing* (NGS) surgiu no ano 2000 (LOMAN; PALLEN, 2015). Neste período, várias plataformas começaram a surgir no mercado e foram acompanhadas de novas abordagens em bioinformática. Com isso, essas novas metodologias fizeram com que o mundo da ciência mudasse sua visão a respeito das abordagens científicas em pesquisas básicas, aplicadas e clínicas (METZKER, 2010).

A principal vantagem oferecida pelo NGS é a habilidade de se produzir uma quantidade enorme de dados de forma mais barata que a tecnologia anterior, em alguns casos, excedendo um bilhão de *short reads* por corrida no instrumento (METZKER, 2010). Em 2012, instrumentos do tamanho de uma impressora a laser traziam na bagagem insumos e custos totais de corrida por preços mais modestos, além de reduzirem o tempo total de realização de todo o processo para alguns dias. Isso significou que, pela primeira vez, o sequenciamento de genoma bacteriano pode sair dos grandes centros de pesquisa e ser realizado em universidades e laboratórios de saúde pública (LOMAN et al., 2012; LOMAN; PALLEN, 2015).

A técnica do NGS é baseada também em um sequenciamento por síntese. Duas plataformas principais são bem conhecidas: a 454 (Roche) denominada como pirosequenciamento (baseada na detecção de moléculas de pirofosfato liberadas durante a incorporação de nucleotídeos) e Miseq e Hiseq (Illumina). O *template* de DNA é fragmentado, adaptadores se ligam aos dois lados de cada fragmento, estes fragmentos se ligam à superfície do canal *flow cell*; no caso da plataforma da Illumina, nucleotídeos e enzimas são adicionados para se iniciar a fase sólida da amplificação em *bridge* (amplificação *in vitro*); vários milhões de *clusters* de cadeias duplas de DNA são gerados em cada canal do *flow cell*; primeiro ciclo químico: para se iniciar o primeiro ciclo de sequenciamento, são adicionados todos os quatro nucleotídeos marcados (*reversible terminators*), iniciadores e a DNA polimerase ao *flow cell*; após isso, ocorre a excitação por laser, seguida de captura de

imagem da fluorescência emitida por cada *cluster* no *flow cell*, gravando assim qual é a primeira base de cada *cluster*; segundo ciclo químico: para se iniciar o próximo ciclo de sequenciamento, são adicionados todos os quatro nucleotídeos marcados novamente e a DNA polimerase ao *flow cell*; repete-se o passo da captura de imagem anterior; a repetição dos ciclos de sequenciamento para determinar as sequências de bases em um fragmento dado, uma única base por vez; finalizando com a análise de bioinformática, quando os dados do alinhamento serão comparados com os de uma sequência de referência (KIRCHER; KELSO, 2010; LOMAN; PALLEN, 2015)

As plataformas de sequenciamento comerciais mais conhecidas são: ABI capillary sequencer (ABI) (*Sanger shotgun sequencing*), 454 GS FLX+ (Roche), Ion torrent (Life Technologies), SOLiD (Life Technologies/Applied Biosystems (ABI)), MiSeq (Illumina), HiSeq (Illumina) (*high-throughput sequencing*), PacBio RS (Pacific Biosciences) e MinION (Oxford Nanopore) (*single-molecule long-read sequencing*) (KIRCHER; KELSO, 2010; METZKER, 2010; LOMAN; PALLEN, 2015).

Em *Y. enterocolitica*, vários estudos vêm sendo realizados com técnicas de sequenciamento de genoma. Desta forma, um grande número de novos genomas podem ser consultados no GenBank (BATZILLA et al., 2011b; WANG et al., 2011; GARZETTI et al., 2013; SAVIN et al., 2013; DALIGAULT et al., 2014; JOHNSON et al., 2015). O GenBank atualmente conta com um total de 156 genomas de *Y. enterocolitica* anotados em seu banco de dados e com acesso público.

Estes dados ajudam no entendimento sobre o microrganismo do ponto de vista molecular, proporcionando uma infinidade de aplicações. Segundo exposição anterior, o sequenciamento genômico, possibilitou desenvolver uma metodologia do MLST mais acurada, além de propiciar estudos em patogenia (HALL et al., 2015). Assim, Reuter e colaboradores (2014) fizeram um trabalho de sequenciamento de genoma em 241 cepas de todas as espécies pertencentes ao gênero *Yersinia*, que serviu para redefinir o real posicionamento de cada representante dentro da árvore da vida deste gênero. Não obstante, ainda sugeriram que a evolução da patogenia, dentro do gênero, se desenvolveu de forma paralela e não de um ancestral comum próximo, diferente do que até então havia se imaginado (REUTER et al., 2014).

Por fim, Tan e colaboradores (2015) com os dados genômicos de 232 representantes de espécies do gênero *Yersinia*, montaram o YersiniaBase (<http://yersinia.um.edu.my>). Trata-se de um banco de dados de acesso público, contendo um robusto arcabouço de dados genômicos e ferramentas de análise para ajudarem nos estudos de *Yersinia* (TAN et al., 2015).

1.14 Proteômica

A proteômica é o estudo sistemático das diversas propriedades das proteínas com o objetivo de fornecer descrições detalhadas da estrutura, função e controle dos sistemas biológicos, tanto no estado de saúde quanto no estado de doença (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A caracterização de proteínas teve seu início na década de 1970, quando surgiram duas técnicas bioquímicas: a eletroforese unidimensional e o sequenciamento de Edman. Nos anos de 1975, foi possível determinar a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas, simultaneamente, com a introdução da metodologia da eletroforese bidimensional (2DE). Contudo, tais técnicas só eram capazes de descrever mapas proteicos com pouca reprodutibilidade. Já na segunda metade da década de 1980, começou uma nova era na identificação de proteínas e peptídeos, utilizando-se espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS), agora, com o desenvolvimento da técnica de ionização suave, tornou-se possível a conversão dos peptídeos em íons. Hoje, figuram como sendo as duas principais técnicas de ionização usando espectrometria de massas de proteínas: a ionização/dessorção à laser auxiliada por matriz (MALDI – *matriz assisted laser ionization/desorption*) e a ionização por electrospray (ESI – *electrospray ionization*) (KARAS; HILLENKAMP, 1988; FENN et al., 1989; SCHWAMBORN; CAPRIOLI, 2010), a primeira técnica é utilizada para analisar misturas mais simples de peptídeos, enquanto a segunda, em conjunto com um sistema de nanocromatografia líquida, é a escolha mais correta para amostras que apresentam uma maior complexidade (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Logo, a adição da cromatografia líquida (LC) ao sistema da espectrometria de massas, gerou um aumento considerável no poder de resolução e identificação dos peptídeos. O conjunto das técnicas, quando utilizado em sequência, é chamado de LC-MS/MS, e possibilita tanto uma análise proteômica de forma direta, para se determinar as proteínas expressas em uma amostra, quanto para realizar uma identificação de proteínas totais sob uma condição predeterminada, isto é, sem um alvo predefinido, com o intuito de cobrir o maior número possível de proteínas expressas por um organismo, naquele determinado momento (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Em 2014, Wiśniewski e Rakus descreveram o método de extração de proteínas baseado no MED-FASP para uma quantificação absoluta de proteína total de *Escherichia coli*. Eles obtiveram a identificação de 2.200 proteínas, com alta reprodutibilidade da técnica e uma aprimorada estimativa de concentração proteica celular. Acresce que a análise quantitativa do conteúdo de DNA por amostra, permitiu o cálculo da quantidade de proteínas por célula

bacteriana, resultando na estimativa do número de cópias da cada proteína. Logo, a metodologia permite de forma relativamente fácil analisar quantitativamente um proteoma bacteriano (WIŚNIEWSKI; RAKUS, 2014a).

Quanto à *Yersinia*, as técnicas para análise do proteoma têm sido utilizadas na realização de diversos estudos: como em *Y. pestis*, onde foi possível observar qual era o contexto fisiológico envolvido na ocorrência de determinadas mutações que influenciavam tanto no metabolismo de aminoácidos quanto na biogênese do envoltório celular (LEISER et al., 2015).

Também, a abordagem proteômica serviu para analisar a expressão de adesinas nas três espécies patogênicas do gênero, nas quais esta classe de proteínas atua de forma fundamental no quesito de patogenicidade de uma cepa (CHAUHAN et al., 2016). Foi descrito um proteoma de *Y. enterocolitica* durante a infecção em células HeLa, demonstrando a expressão diferencial de proteínas durante o curso da infecção e, quais foram as funções moleculares, bem como as vias metabólicas, alteradas neste período. Em conclusão, o estudo proteômico revelou um maior entendimento a respeito da patogenia de *Y. enterocolitica* em células epiteliais humanas (ALUGUBELLY et al., 2016).

1.15 Justificativa e relevância

Nos últimos anos, temos estudado este microrganismo através da identificação de cepas portadoras do mesmo genótipo circulando por vários estados do Brasil, provenientes de suínos e do homem. Várias apresentavam diversos fatores de virulência, demonstrando que ainda possuíam um alto potencial patogênico (PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014). Admite-se que o monitoramento destes genótipos poderá se constituir em elementos ou ferramentas de extrema utilidade às análises epidemiológicas no estudo da yersiniose em nosso meio.

Diante do exposto, fica evidente que o estudo dos fatores de virulência poderá também ajudar a entender melhor a dinâmica da doença, assim como para estender conhecimentos ou subsídios a esfera terapêutica da infecção, e acima de tudo, revelar o potencial de virulência das cepas circulantes no nosso país. Concomitantemente os ensaios sobre a prevalência de *Y. enterocolitica* no trato intestinal (fezes) humano indicará sua real ocorrência no nosso meio, assim como as investigações sobre suas proteínas expressas poderá servir para a seleção de um marcador diagnóstico das formas patogênicas no Brasil. Nossos estudos indicam que *Y. enterocolitica* possa estar mais presente no nosso meio do que tem sido relatada, isto

provavelmente se dá em decorrência da subnotificação ou, acima de tudo, pela carência investigativa do patógeno.

Como ponto de extrema relevância destacam-se as diversas técnicas moleculares, válidas para o rastreamento epidemiológico. Assim a genotipagem, em *Y. enterocolitica*, teve um grande avanço nas últimas décadas, e vários métodos baseados no DNA vêm sendo utilizados para sua caracterização, inclusive no Brasil (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Citam-se aqueles com um maior poder discriminatório frente ao PFGE, representados pelo MLVA e o MLST. Tais técnicas permitem estabelecer as correlações filogenéticas dentre amostras bacterianas patogênicas e não patogênicas, logo figurando como fundamentais nos estudos epidemiológicos (MAIDEN et al., 1998; KOTETISHVILI et al., 2005; SIHVONEN et al., 2011).

É importante salientar a carência de relatos de aspectos genômicos e proteômicos em amostras isoladas no Brasil. Desta forma, dando continuidade ao projeto do mestrado, e tendo observado a presença de alguns genótipos circulantes no homem e nos animais (principalmente o suíno) em várias regiões do Brasil, a proposta deste projeto se concentrou na realização da análise molecular detalhada nestas cepas, lançando mão de processos e/ou métodos mais acurados da atualidade, capazes de avaliar a diversidade genética e a composição de proteínas na amostragem selecionada de *Y. enterocolitica*.

Finalizando, *Y. enterocolitica* é uma realidade no nosso país, e não podemos fechar os olhos para um patógeno de relevância em saúde pública e mundialmente difundido. Estudos com técnicas mais modernas permitem ter um retrato inequívoco, sobre vários aspectos, a respeito das cepas circulantes. Além disso, como estudo adicional, desenvolve-se uma metodologia de PCR para a identificação/detecção do sorotipo O:3 direto do espécime em análise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a análise molecular detalhada das cepas de *Y. enterocolitica* isoladas no Brasil utilizando métodos que permitam avaliar a diversidade genética e a composição de proteínas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os genes de virulência das cepas isoladas nas coproculturas e nas mantidas na coleção a partir da PCR;
- Estabelecer as relações filogenéticas dos isolados de *Y. enterocolitica* pela técnica do MLST;
- Identificar quais proteínas são expressas e selecionar quais podem ser marcadores para o diagnóstico de cepas patogênicas;
- Analisar, através do sequenciamento de nova geração, quais os genes envolvidos na virulência, resistência a antimicrobianos e qual o contexto genético dos genes identificados;
- Propor uma metodologia molecular para identificação/detecção de *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e fluxograma do estudo

1- 56 cepas pertencentes à Coleção de *Listeria/ Yersinia* (CLIST - LABZOO/IOC/FIOCRUZ) do biotipo 4 sorotipo O:3 (50), do biotipo 1A sorotipos O:5 (2), O:4 (1), O:6 (1) e do biotipo 2 sorotipo O:5b (2) de origens humana e animal (Figura 3-1).

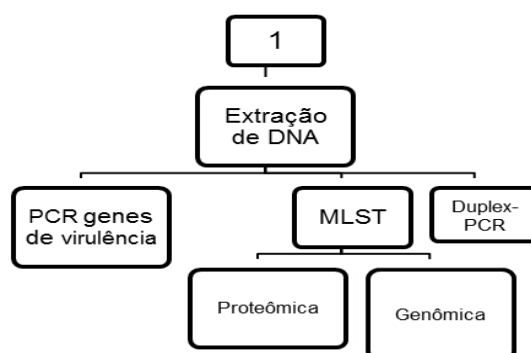


Figura 3-1 - Fluxograma mostrando o caminho que as amostras do grupo 1 seguiram dentro do estudo. PCR - *Polimerase Chain Reaction*; MLST - *Multilocus Sequence Typing*.

2- 15 amostras de DNA pertencentes ao Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP), do biotipo 4 sorotipo O:3 de origem humana (Figura 3-2).

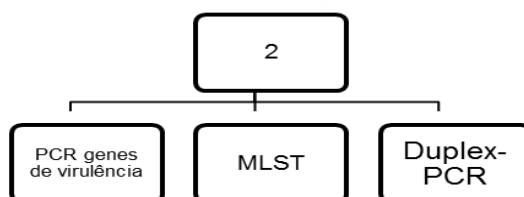


Figura 3-2 - Fluxograma mostrando o caminho que as amostras do grupo 2 seguiram dentro do estudo. PCR - *Polimerase Chain Reaction*; MLST - *Multilocus Sequence Typing*.

3- 1 amostra de fezes do biótipo 1A, sorotipo O:7, proveniente do crescimento bacteriano de fezes de grávidas HIV positivas do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG-UFRJ) e de fezes de grávidas saudáveis do município de Petrópolis – RJ (Figura 3-3).

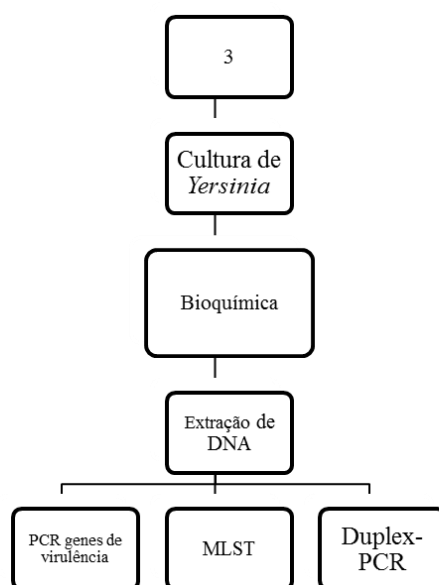


Figura 3-3 – Fluxograma mostrando o caminho que a amostra do grupo 3 seguiu dentro do estudo. PCR - *Polimerase Chain Reaction*; MLST - *Multilocus Sequence Typing*.

3.2 Análise da presença de *Y. enterocolitica* nas fezes de grávidas HIV positivas.

Foi realizado um estudo de caso-controle, durante os anos de 2015-2016, com dois objetivos principais: analisar a presença de *Yersinia* nos grupos de estudo (grávidas com HIV/ grávidas sem HIV) e testar a técnica de Duplex-PCR para detecção de *Y. enterocolitica*. A análise se baseou no resultado obtido da PCR no crescimento bacteriano proveniente das fezes dos dois grupos de estudo, tendo como desfecho a amplificação da banda do gênero *Yersinia* ou a do sorotipo O:3 o que confirmaria a presença de *Y. enterocolitica*. Também foi realizado o isolamento nos meios de cultura clássicos e posterior identificação bioquímica e sorológica de colônias suspeitas, para se comparar com os resultados obtidos da PCR.

O estudo foi realizado com a análise de colônias bacterianas crescidas em meios de cultura, oriundas de 74 fezes correspondentes a grávidas HIV positivas do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da UFRJ (IPPMG-UFRJ) e 74 fezes de grávidas saudáveis do município de Petrópolis – RJ.

Projeto aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC sob o número 1.308.312.

Realizou-se o teste de independência do qui-quadrado (χ^2) para avaliar se os dois grupos são independentes e o teste do odds ratio (O.R.) para a avaliação do risco de ser portador de *Yersinia*. O programa estatístico utilizado foi o R commander (RCMDR).

Esse estudo só pôde ser realizado devido à parceria com o projeto intitulado “Avaliação da prevalência do agente etiológico *Listeria* spp em gestantes HIV positivas”, o qual foi aprovado pelo CEP do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da UFRJ sob o número 608.313.

3.3 Cultura para *Yersinia*

As fezes, na quantidade de um grama cada, foram cultivadas em 9 ml de *Cold Manithol Broth* (Quadro 3-1) e crio-enriquecidas por 21 dias a 4°C, utilizando sua característica psicrófila como fator seletivo frente à microbiota associada (PEIXOTTO et al., 1979). Depois dos 21 dias elas foram repicadas para os meios seletivos CIN (Oxoid) e MacConkey (Oxoid) e as colônias características ou suspeitas foram repicadas para o meio de triagem de Costa & Vérnin (C.V.) (COSTA; HOFER, 1972) e incubadas a 37°C por 18-24 horas, permitindo a identificação presuntiva do gênero, seguindo então para a caracterização bioquímica e sorológica.

<i>Cold Manithol Broth</i>	
Substância	Quantidade
NaCl	8,5 g
K ₂ HPO ₄	10 g
D-mannitol	2 g
Água destilada	1000 ml

Quadro 3-1- Preparo do *Cold manithol broth*.
g = grama; ml = mililitros; pH 7,5 (esterilização a 121°C por 10 minutos)

3.4 Caracterização bioquímica e sorológica

O perfil bioquímico foi realizado 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 (Voges-Proskauer a 25°C), capacidade de descarboxilação da ornitina (ODC), indol em meio SIM (Motilidade, Indol, Sulfeto – Oxoid), Citrato de Simmons como fonte única de carbono, fermentação da sacarose, xilose, esculina, arginina desidrogenase. Uma vez confirmadas como *Yersinia*, às amostras foram semeadas em tubos Ágar nutriente inclinado (Difco).

O crescimento obtido nos tubos, após incubação de 24 h a 37°C, foi suspenso em 1 a 2 ml de solução a 0,85% de cloreto de sódio. A seguir, a caracterização sorológica foi realizada com antissoros O (somático) específicos, através da soroaglutinação rápida em lâmina (ASENSI; HOFER, 1985). Os antissoros somáticos foram preparados pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/Fiocruz, RJ, de acordo com a orientação técnica de Winblad (1967) e utilizando as amostras de referência. Grupos sorológicos 1 até 10, incluindo 5A e 5B.

Na classificação em biotipos a amostragem de *Y. enterocolitica* foi analisada segundo os esquemas de Wauters (1981) e Mollaret *et al.* (1990), descritos no Quadro 3-2.

Biotipos								
Provas	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	+	+	+	+	+	+	+	-

Quadro 3-2 - Biotipificação de *Yersinia enterocolitica* (Wauters (1981); Mollaret et al.(1990)).

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

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

3.5 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada através do kit de extração de DNA (DNeasy® Blood & Tissue Kit-Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Já a extração do DNA das fezes foi realizada através do kit de extração de DNA (QIAamp® DNA Stool Mini Kit-Qiagen), também seguindo a metodologia do fabricante.

3.6 Duplex-PCR para detecção de *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3.

Em paralelo a identificação e ao isolamento nos meios de cultura clássicos, foi desenvolvida uma reação de Duplex-PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para detecção/identificação rápida de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 direto do DNA total extraído de um espécime a ser analisada. Utilizando os iniciadores para o fator *tufA* (*Forward* - 5'-ACATCCTGTTGGGTCGYCA-3' e *Reverse* - 5'-TCTTTGCTCAGAATATAAACTTCTGA-3') (DALMASSO et al., 2014) amplificando um produto de 587 pb, como marcador para o gênero *Yersinia*, e o *rfbC* (F - 5'-CGCATCTGGGACACTAATTTCG-3' e R - 5'-CCACGAATTCCATCAAACCACC-3') (WEYNANTS et al., 1996) amplificando um produto de 405 pb, como marcador de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3. O ciclo e as condições da PCR foram desenvolvidos no próprio laboratório, e para o preparo da mistura da PCR foi utilizado o *Taq* PCR Kit (BioLabs) em um volume final de 25 µl por amostra, contendo 13,7 µl de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q); 5 µl do tampão PCR 5X; 2 µl de 2 mM MgCl₂; 1 µl de dNTP (0,2 mM cada); 0,3 µl de 1 U da *Taq* DNA polimerase; 1 µl de cada iniciador (concentração de 25 pmoles) e 1 µl de DNA (100 ng). Os ciclos de amplificação da PCR foram: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação de 1 minuto a 94°C, de anelamento de 1 minuto a 56°C e extensão de 1 minutos a 72°C, seguido de uma extensão final de 5 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 e o gel corado em solução aquosa de 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e visualizado sob a luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies).

Na avaliação da eficiência da reação de PCR foram utilizadas as amostras contidas no Quadro 3-3. Todas as cepas utilizadas neste estudo pertencem a Coleção de *Listeria/ Yersinia* (CLIST - LABZOO/IOC/FIOCRUZ), além das amostras de DNA pertencentes ao Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* spp. outras que *Y. pestis* (FCFRP-USP).

Espécie	Cepa	Nº de amostras
Cepas de <i>Yersinia</i> da CLIST		
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:1,2,3		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:2,3		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3		65
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:4		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:5		4
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:6		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:7		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:18		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:19,8		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:22		1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:47		1
Cepas padrões de <i>Yersinia</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	CIP 81.41	1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:5,27	CIP 106676	1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:6,30	CIP 107202	1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8	CIP 80.27T	1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	CIP 81.42	1
<i>Yersinia kristensenii</i>	CIP 9993	1
<i>Yersinia frederiksenii</i>	CIP 8029	1
<i>Yersinia ruckerii</i>	ATCC 29473	1
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	IAL 1793	1
Controle negativo		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC 10708	1
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29004	1
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 29513	1

Quadro 3-3 - Amostras de *Yersinia* e do controle negativo avaliadas com a Duplex-PCR. CIP - Collection del'Institut Pasteur; ATCC - American Type Culture Collection; IAL - Instituto Adolfo Lutz/ São Paulo, SP.

A amostra padrão de *Y. enterocolitica* CIP 81.14 foi escolhida para amplificação dos fragmentos de *tufA* e *rfbC* utilizando-se os iniciadores e o ciclo proposto. Os fragmentos amplificados foram sequenciados na Plataforma RPT01A – Sequenciamento de DNA - PDTIS-IOC, para tanto, foi utilizado o kit de ciclo de sequenciamento Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com posterior análise no ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Usando os fragmentos sequenciados, realizou-se uma pesquisa BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) em todas sequências do gene *tufA* dentro e fora do gênero *Yersinia* presentes no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências com os maiores níveis de similaridade (acima de 80% de identidade nucleotídica) com as da CIP 81.14 foram alinhadas com as sequências dos iniciadores *tufA* e *rfbC*.

3.7 Detecção molecular dos genes de virulência através da PCR

Foram analisadas a presença dos genes *inv*, *ail*, *virF* e *ystA* através da técnica da PCR com seus respectivos iniciadores e seguindo a metodologia da referência de cada iniciador de acordo com o Quadro 3-4.

Gene	Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Referência
<i>inv</i>	YC1(F)	CTG TGG GGA GAG TGG GGA AGT TTG G	570	(RASMUSSEN et al., 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 et al., 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 et al., 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, 1991)
	VirF2 (F)	ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG		

Quadro 3-4 - Iniciadores dos genes de virulência *inv*, *ail*, *virF* e *ystA* e seus respectivos amplicons.
F – Forward; R - Reverse

Para o preparo da mistura da PCR foi utilizado o Kit Platinum® PCR Super Mix (Invitrogen) em um volume final de 25 µl contendo 12,5 µl da Platinum PCR Super Mix, 9,5 µl de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q), 1 µl de cada par de iniciador (concentração de 20 pmol) e 1 µl de DNA (100 ng). 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 de 0,5

µg/ml de brometo de etídeo e visualizado sob a luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies).

3.8 Genotipagem pelo MLST

A identificação genética das linhagens dos isolados foi determinada através da amplificação e sequenciamento dos fragmentos de sete genes constitutivos: *aarF* (proteína UbiB que atua na biossíntese da ubiquinona), *dfp* (síntese do fosfopantotenato/ descarboxilase bifuncional fosfopantotenoilcisteína), *galR* (regulador da ligação transcricional ao DNA), *glnS* (glutamil tRNA sintetase), *hemA* (glutamil tRNA redutase), *rfaE* (Heptose 7-fosfato quinase bifuncional / Heptose 1-fosfato adeniltransferase) e *speA* (arginina descarboxilase). Os iniciadores, as condições e o ciclo de amplificação para realização da PCR foram realizados seguindo a metodologia do *Yersinia* MLST website (<http://pubmlst.org/yersinia/>)(HALL et al., 2015). O kit da PCR utilizado foi o *Taq* PCR Kit (BioLabs) em um volume final de 54,3 µl por amostra, contendo 40 µl de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q); 5 µl do tampão PCR 5X; 5 µl de 1,5mM MgCl₂; 2 µl de 10 µM dNTP; 0,3 µl de 1 U da *Taq* DNA polimerase; 0,5 µl de cada iniciador (concentração de 10 pmol) e 1 µl de DNA (10 ng/µl). Os ciclos de amplificação da PCR foram: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94°C, de anelamento de 30 segundos com à temperatura variando de acordo com o iniciador (Quadro 3-5) e extensão de 30 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72°C e mantido no final do ciclo a 4°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 de 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e visualizado sob a luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies).

Genes	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Tamanho do produto da PCR (pb)	Tamanho das regiões do MLST (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>aarF</i>	5'-ttccatgcagatatgcacc-3'	3'-ccactcactaatagttagc-5'	650	500	52
<i>dfp</i>	5'-gatccggtagcgtttatcag-3'	3'-cataacggctgacaatctcg-5'	547	455	59
<i>galR</i>	5'-attggaacggttaccatg-3'	3'-gttgggctgaacatattggt-5'	648	500	59
<i>glnS</i>	5'-gaatcatgtatccgtgatg-3'	3'-gcacagaaataaccttcac-5'	557	442	56,5
<i>hemA</i>	5'-atgactctgctgcattagg-3'	3'-cggttggaataatcatatg-5'	602	490	54
<i>speA</i>	5'-atgtctgatgataactgatt-3'	3'-cagataaactttatggccc-5'	550	452	55,5
<i>rfaE</i>	5'-atgaaagtcactctgcctga-3'	3'-atcactgccttaggatc-5'	509	429	55,5
<i>rfaE*</i>	5'-atgaaagtcacgctgcctga-3'	3'-ggatagatttggtgtcagtagc-5'	550	429	57,5

Quadro 3-5 - Iniciadores do MLST com o tamanho dos seus produtos e temperaturas de anelamento.

* Esse segundo set de iniciadores do gene *rfaE* foi desenvolvido para as amostras de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 de origem alemã, devido à baixa qualidade da sequência produzida pelos iniciadores originais.

Os produtos amplificados foram purificados usando GFX PCR DNA gel band purification kit (GE Healthcare, UK) seguindo a metodologia do fabricante e sequenciados na Plataforma RPT01A – Sequenciamento de DNA - PDTIS-IOC. As análises e comparações das sequências foram realizadas com o auxílio do BLAST e do Bioedit version 7.0.9 (Ibis Biosciences). As sequências foram analisadas e comparadas com o banco de dados contendo as sequências tipo (*sequence type* – ST) e a análise filogenética no site do PubMLST (JOLLEY; MAIDEN, 2010). A árvore filogenética foi montada no eBURST (<http://eburst.mlst.net/>).

3.9 Proteômica

Para se analisar a expressão de proteínas totais foi utilizada a técnica do MED-FASP (*Multi-enzyme digestion - Filter Aided Sample Preparation*) (WIŚNIEWSKI; RAKUS, 2014a, 2014b) a qual se baseia na lise das células com SDS, seguida de digestão consecutiva com duas enzimas proteolíticas e separação dos peptídeos através de um filtro de concentração (filtro Microcon-30kDa - Millipore®). A amostra selecionada para este estudo

foi a cepa de *Y. enterocolitica* YE 54 de origem humana, sorotipo O:3/ biotipo 4, pertencente a CLIST, a qual apresentou o plasmídeo pSTU288-2 (HOOTON et al., 2014).

Foram preparadas as seguintes soluções para realização da primeira etapa da técnica supracitada:

Tampão de lise – LB (*lysis buffer*)

- Tris (Sigma) 0,05 M – 0,151 g para 25 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1-Mili-Q) (pH 7,6);
- DTT (Ditiotreitol) (Sigma) 0,05 M – 0,077 g para 10 ml;
- SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) (Bio-Had) 2% (pó) - 0,2 g para 10 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1- Mili-Q);
- Volume final – 10 ml

Tampão de digestão – DB (*digestion buffer*)

- Tris (Sigma) 0,05 M – 0,302 g para 50 ml de água estéril ultra pura (Tipo 1-Mili-Q) (pH 8,5);
- Volume final – 50 ml

Tampão UA

- Tris (Sigma) 0,1 M – 0,6057 g para 50 ml (pH 8,5);
- Ureia (Kasvi) 8 M – 4,8 g para 10 ml (x5 = 24 g para 50 ml);
- Volume final – 50 ml

Solução IAA

- IAA (Iodoacetamida) 0,05 M - 0,0925 g para 10 ml de UA (sem DTT);

A amostra selecionada foi semeada em triplicatas, uma triplicata a 37° C e outra a temperatura ambiente (28°C), em 50 ml de caldo Luria-Bertani (Oxoid) e incubada, sob agitação de 250 rpm, por 15 horas. Desta maneira, quis se observar a diferença na expressão de proteínas nas duas temperaturas. Em seguida foram centrifugadas a 4.000 rpm sob uma temperatura de 4° C por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e o precipitado (*pellet*) foi lavado mais duas vezes em 10 ml de tampão PBS (solução tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) obedecendo aos mesmos critérios da centrifugação anterior.

Para a lise das proteínas em SDS, as células bacterianas (*pellet*) foram misturadas com 5 vezes o volume do tampão de lise (LB), os lisados foram submetidos a banho de ultrassom por 30 min (para facilitar a lise da célula) e incubados no Termoblock a 100°C por 5 minutos, posteriormente mantidos à temperatura ambiente. O lisado foi clarificado por centrifugação a

10.000 rpm, por 5 min a 16°C, posteriormente transferido para um novo tubo e quantificado (espectrofotômetro NanoDrop® 2000 - Thermo Scientific).

Seguindo o FASP – *standard protocol* (10-300 ug de proteína total), foi adicionado 0,077 g de DTT (0,05 M) em 10 ml de UA. Já 200 µg do extrato de proteínas foram diluídos a um volume de 200 µl em tampão UA, carregados no filtro 30 kDa e centrifugado a 10.000 rpm (até que sobresse aproximadamente 10 µl no filtro) por 10-15 min. O eluido foi repassado pela membrana junto com 100 µl de UA + DTT e centrifugado a 10.000 rpm por 10-15 minutos, em seguida, adicionou-se 200 µl de UA + DTT e posterior centrifugação a 10.000 rpm por 10-15 minutos.

Após a última centrifugação, descartou-se o filtrado do tubo coletor, seguido por um passo de aquilação através da adição a membrana de 100 µl de solução IAA, incubação sob escuridão por 20 minutos, e posterior agitação em termomixer a 600 rpm por 1 minuto (como alternativa pode-se agitar o tubo manualmente por 1 minuto). Os filtros foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, adicionou-se 100 µl de UA (sem DTT) com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos novamente (este passo foi repetido mais uma vez). Foram adicionados 100 µl do tampão DB e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos (este passo também foi repetido mais uma vez). Foram adicionados 40 µl do tampão DB com enzima lisil-endoproteínase na razão 1:200 (LEP – Wako Chemicals USA) e agitados manualmente por 1 minuto (ou termomixer a 600 rpm). Após a adição da endoproteínase as amostras foram incubadas de 3-4 horas a 37°C, posteriormente a incubação, se for o caso, se separa a fração de LEP da fração da Tripsina. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos, para se retirar os peptídeos digeridos pela LEP, os quais foram coletados em um tubo novo. Adicionou-se 100 µl do tampão DB e centrifugou-se a 12.000 rpm por mais 5 minutos ou até passagem total do volume. Foi adicionado 40 µl do tampão DB com Tripsina (Promega) na razão 1:100 e as amostras foram incubadas a 37°C *overnight*.

Após o período de incubação, os peptídeos foram retirados através da centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Por fim, os peptídeos foram quantificados no NanoDrop® e 20 µg foram separados, secos em *speed vac* e dessalinizados por C18 (cromatografia de fase reversa) para análise do proteoma total das amostras analisadas.

Já as análises de espectrometria de massa foram feitas na plataforma RPT02A - Espectrometria de Massa do Instituto Oswaldo Cruz. Quatro µg de peptídeos foram separados em coluna de fase reversa e analisados em espectrômetro de massas Q Exactive (Thermo Scientific, USA). Os peptídeos foram separados em colunas de fase reversa (50 cm x 75 µm de diâmetro), "empacotados" em partículas C18 de 1,8 µm, usando um gradiente por 4 h de

acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico a 250 nl/min. O Q Exactive foi operado no modo "data-dependent" com uma varredura de aquisição em uma resolução de 50.000 a 400 m/z (tempo de injeção 256 ms). Para cada espectro, os 12 íons precursores mais abundantes com carga $\geq +2$ foram selecionados com uma janela de isolamento de 1,6 Th e fragmentados por HCD (*higher energy collision dissociation*), com energia de colisão normalizada de 25. Os tempos máximos de injeção dos íons para MS e MS/MS foram 20 ms e 60 ms, respectivamente. O valor do íon alvo para os dois modos de varreduras foi de 106. A exclusão dinâmica foi de 25 s e 10 ppm, sendo as amostras analisadas em triplicata técnica.

O software MaxQuant foi utilizado para identificar as proteínas com base no banco de dados contendo as sequências das proteínas de *Yersinia*, obtidas de UniProt (<http://www.uniprot.org/>), e as sequências "decoy" (sequência original das proteínas oriundas do UniProt escritas automaticamente de maneira reversa). O banco de dados foi complementado com contaminantes frequentemente observados (tripsina porcina, lisil endopeptidase de *Achromobacter lyticus*, e queratinas humanas) e suas sequências invertidas. A pesquisa seguiu os parâmetros: uma tolerância no MS de 5 ppm, uma tolerância no MS/MS de 10 ppm, duas clivagens perdidas da tripsina, carbamidometilação de cisteína definida como uma modificação fixa e oxidação de metioninas e acetilação N-terminal definidas como modificações variáveis. Foram calculados os FDRs (*False Discovery Rate*) com base no número de vezes que o software identifica as proteínas na base de dados decoy. Como critério de confiabilidade de identificação, foi utilizado um FDR 0,01, ou seja, no máximo 1%.

O método de Proteína Total (TPA - *Total Protein Approach*) foi utilizado sem marcação para quantificação absoluta das proteínas.

O software Perseus (versão 1.5.3.2) foi utilizado para realizar a comparação das distintas replicatas biológicas e as distintas condições, bem como a análise estatística das diferenças em abundância entre as proteínas identificadas em cada condição. Para esta análise foram consideradas apenas as proteínas identificadas em duas replicatas biológicas de pelo menos um grupo. Aplicamos o teste t de *Student* para a comparação aceitando diferenças com FDR de 0,01 (1%).

Para as análises de fosfoproteômica diferencial foram considerados somente fosfossítios com delta score > 6 (indicando confiabilidade da posição do fosfossítio) e identificados em duas das três replicatas em pelo menos um grupo. O teste estatístico aplicado neste caso foi o teste t de Welch considerando significativas apenas proteínas com uma diferença absoluta de três e valor de $p < 0,05$.

A abundância protéica foi calculada com base na intensidade espectral da proteína (intensidade bruta, não intensidade LFQ) utilizando o conceito TPA, de acordo com o método

descrito por Wisniewski e Rakus em 2014. O conteúdo proteico total foi definido como sendo a soma das intensidades integradas de peptídeos sob o perfil de eluição de cada peptídeo. A quantidade de proteínas individuais foi calculada como sendo a razão da sua intensidade (*MS*) sobre a soma de todas as intensidades (*MS*) na amostra medida (Figura 3-4):

$$\frac{\text{Massa da proteína}}{\text{Massa do total de proteínas}} \approx \frac{\text{Intensidade (MS) da proteína}}{\text{Intensidade (MS) total das proteínas}} = \text{“Total protein”}$$

Figura 3-4 - Cálculo do conteúdo proteico total (*Total protein*) (Adaptado de Wisniewski; Rakus (2014a)).

A concentração molar das proteínas por grama total de proteína foi calculada por (Figura 3-5):

$$\frac{\text{“Total protein” (da proteína)} \times 10^6}{\text{peso molecular (da proteína)}} = \text{Concentração (pmol/mg) (da proteína)}$$

Figura 3-5 - Concentração molar de proteínas (Adaptado de Wisniewski; Rakus (2014a)).

Todos os cálculos foram realizados no Microsoft Excel.

3.10 Sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS)

As amostras selecionadas para este estudo foram três cepas de *Y. enterocolitica* de origem humana, duas sorotipos O:3/ biotipo 4 (YE 19 e YE 54) e outra sorotipo O:5/biotipo 1A (YE 51), uma de origem suína do sorotipo O:3/ biotipo 4 (YE 17) (pertencentes a CLIST) e uma padrão do Instituto Pasteur (CIP 81.41) do biossorotipo 4/O:3.

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit de extração de DNA (DNeasy® Blood & Tissue Kit-Qiagen) seguindo a metodologia do fabricante, e a quantificação foi realizada no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Para o preparo da biblioteca de DNA utilizou-se o Nextera XT (Illumina, San Diego, CA). O sequenciamento de nova

geração foi realizado em conjunto com a Plataforma RPT01J - Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração do IOC e utilizou-se a *Illumina HiSeq sequencing platform* (HiSeq 2500 - Illumina Inc., USA), gerando 100 bp *paired-end reads*. Os dados foram processados com a ferramenta *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) e os *paired-end reads* foram mesclados através do programa FLASH (*Fast Length Adjustment of SHort reads* - v1.2.11) (MAGOČ; SALZBERG, 2011). Uma montagem *de novo* foi realizada usando o programa SPAdes (v3.7.1) (BANKEVICH et al., 2012). A ferramenta Ragout (v1.2) (KOLMOGOROV et al., 2014) foi utilizada como assistente de referenciamento da montagem dos *contigs* gerados contra o genoma da cepa *Yersinia enterocolitica* subsp Y11 depositada no NCBI (número de acesso no NCBI: NC_017564.1) (BATZILLA et al., 2011b). O Sealer (v1.9.0) (PAULINO et al., 2015) e o Pilon (v1.16) (WALKER et al., 2014) foram utilizados para o preenchimento das lacunas e correção final da montagem, respectivamente. A montagem final foi analisada utilizando REAPR (v1.0.18) (HUNT et al., 2013) e QUAST (v3.2) (GUREVICH et al., 2013), e o modelo final dos genomas ficaram compreendidos dentro de um *scaffold* (5000000 bp), o qual foi anotado pela ferramenta Prokka (v1.11) (SEEMANN, 2014).

Para a investigação dos fatores de virulência de *Yersinia* foi utilizado o programa SRST2 (v0.1.7) (INOUYE et al., 2014) que fez uma procura, nas *reads* geradas, tendo como base o VFDB (*Virulence Factors of Bacterial Pathogens* – disponível em: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Já para a procura dos genes de resistência aos antimicrobianos recorreu-se ao ARG-ANNOT (*Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation*) (GUPTA et al., 2014) e ao ResFinder (disponível em: <http://www.genomicepidemiology.org>).

Na amostra YE 54, na qual foi encontrada o plasmídeo pSTU288-2 (HOOTON et al., 2014), ainda foi realizada a análise da susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método da difusão em ágar, segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017 (CLSI, 2017) para enterobactérias, utilizando-se discos impregnados com as seguintes drogas e respectivas concentrações (OXOID): clorofenicol (C) 30 µg, gentamicina (CN) 10 µg, estreptomicina (S) 10 µg e tetraciclina (TE) 30 µg.

O critério de escolha para estes fármacos tomou ainda por referência, o plasmídeo encontrado poder carrear genes para a resistência aos mesmos. Neste estudo, o aminoglicosídeo neomicina foi substituído pela gentamicina. Como controle para todos os antibióticos foi utilizada *Escherichia coli* ATCC 25922.

A amostra foi crescida 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 25 ml 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 foi 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.

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.

As placas eram invertidas e incubadas a 35°C por um período de 16 à 18 h. Após a incubação, o diâmetro dos halos é medido, incluindo o diâmetro dos discos, em milímetros, com um paquímetro. Com os resultados obtidos, a cepa foi classificada como: sensível ou resistente.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção molecular dos genes de virulência de cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de fonte animal e humana através da PCR

Os resultados da PCR para os genes de virulência e informações quanto à fonte, data da coleta, origem e sorotipo/biotipo das 72 amostras estudadas estão relacionados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Resultado da PCR dos genes de virulência, fonte, ano da coleta e sorotipo/biotipo das 72 amostras de *Y. enterocolitica* analisadas.

Amostras	Fonte	Data	Origem	Genes de Virulência	Sorotipo/Biotipo
YE 01	AN - Suíno	2007	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 02	AN - Suíno	2007	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 03	AN - Suíno	2007	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 04	AN - Suíno	2007	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 05	AN - Suíno	2007	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 06	AN - Suíno	2007	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 07	AN - Suíno	2007	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 08	AN - Suíno	2007	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 09	AN - Suíno	2007	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 10	AN - Suíno	2008	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 11	AN - Suíno	2008	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 12	AN - Suíno	2008	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 13	AN - Suíno	2008	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 14	AN - Suíno	2008	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 15	AN - Suíno	2008	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 16	AN - Suíno	2008	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 17	AN - Suíno	2008	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 18	HU - Sangue	2008	PR	Sem amplificação	O:3/4
YE 19	HU - Sangue	2005	RJ	Sem amplificação	O:3/4
YE 20	HU - Fezes	2008	PR	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 21	HU	2008	MG	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 22	HU - Sangue	2008	SC	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4

Amostras	Fonte	Data	Origem	Genes de Virulência	Sorotipo/Biotipo
YE 25	HU - Sangue	2009	PR	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 26	HU - Swab retal	2010	MG	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 27	HU - Swab retal	2010	MG	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 28	HU - Swab retal	2011	MG	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 29	HU - Swab retal	2011	MG	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 30	HU – Hemocomp.	2011	PR	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 31	HU - Fezes	2011	PR	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 32	AN - Suíno	2008	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 33	AN - Suíno	2008	SP	Sem amplificação	O:3/4
YE 34	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 35	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 36	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 37	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 38	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 39	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 40	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 41	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 42	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 43	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 44	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 45	AN - Suíno	1990	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 46	AN - Suíno	1980	RJ	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
YE 47	AN - Sagui	2002	RS	<i>inv, ail, ystA</i>	O:5b/2
YE 48	AN - Sagui	2002	RS	<i>inv, ail, ystA</i>	O:5b/2
YE 49	HU - Fezes	1982	RJ	<i>inv</i>	O:5/1A
YE 50	HU - Fezes	1982	RJ	<i>inv</i>	O:4/1A
YE 51	HU - Fezes	1982	RJ	<i>inv</i>	O:5/1A
YE 52	HU - Sangue (bebê)	2015	MG	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 53	HU - Swab retal (bebê)	2015	MG	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 54	HU - Sangue	2015	PR	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 55	HU - Fezes	2015	PR	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
YE 56	HU-Fezes	1982	RJ	Sem amplificação	O:6/1A
YE57	HU-Fezes (Grávida)	2016	PE/RJ	Sem amplificação	O:7/1A

Amostras	Fonte	Data	Origem	Genes de Virulência	Sorotipo/Biotipo
FCF 63	HU - Fezes (criança)	1981	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 82	HU - Fezes	1982	PE	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 376	HU - Fezes	1984	SP	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
FCF 393	HU - Fezes (criança)	1986	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 418	HU - Fezes	1988	SP	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4
FCF 472	HU - Fezes (criança)	1991	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 524	HU - Swab retal (criança)	1992	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 544	HU - Fezes (criança)	1993	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 548	HU - Fezes (criança)	1995	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 558	HU - Fezes (criança)	1996	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 576	HU - Fezes (criança)	1997	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 609	HU - Fezes (criança)	2000	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 613	HU - Fezes	2003	SP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	O:3/4
FCF 618	HU - Fezes (criança)	2008	SP	<i>inv, ail, ystA</i>	O:3/4

YE – *Yersinia enterocolitica*, FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), SP- São Paulo, PR – Paraná, SC – Santa Catarina, BA – Bahia, MG – Minas Gerais, RJ – Rio de Janeiro, PE/RJ – Petrópolis, PE – Pernambuco, RS – Rio Grande do Sul, AN – Animal, HU – Humano, Hemocomp – hemocomponente.

Foram isoladas 32 amostras de suínos, obtidas da região tonsilar, língua e fezes na fase do abate nas cidades de Campinas (SP), Seropédica (RJ) e Niterói (RJ), dos anos de 1980, 1990, 2007 e 2008; dois isolados de fígado de sagui da cidade de Passo Fundo (RS) de 2002; e 38 isolados humanos de sangue e fezes de Minas Gerais, Rio de Janeiro (Petrópolis), Paraná, Santa Catarina, Bahia, São Paulo e Pernambuco dos anos de 1980 até 2016. A frequência com que esses genes de virulência foram encontrados nesta amostragem está representada na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Frequência dos genes de virulência nas 72 amostras de *Y. enterocolitica*.

Genes de virulência	Nº amostras	Porcentagem
<i>inv</i>	58	80
<i>ail</i>	55	76
<i>ystA</i>	55	76
<i>virF</i>	26	36

A análise da frequência do gene de virulência de acordo com sorotipo/biotipo encontra-se na Tabela 4-3.

Tabela 4-3 - Frequência dos genes de virulência por sorotipos/biotipos das 72 amostras de *Y. enterocolitica*.

Genes de virulência	Sorotipos/Biotipos			
	O:3/4 n (%)	O:5/1A n (%)	O:5b/2 n (%)	O:4/1A n (%)
<i>inv</i>	53(81)	2(100)	2(100)	1(100)
<i>ail</i>	53(81)	-	2(100)	-
<i>ystA</i>	53(81)	-	2(100)	-
<i>virF</i>	26(40)	-	-	-
Total	65	2	2	1

Já os resultados da frequência dos genes de virulência quanto à origem se encontram na Tabela 4-4.

Tabela 4-4 - Frequência dos genes de virulência por fonte de isolamento das 72 amostras de *Y. enterocolitica*.

Genes de virulência	Fontes		
	Suíno n (%)	Sagui n (%)	Humana n (%)
<i>inv</i>	22(67)	2(100)	34(89)
<i>ail</i>	22(67)	2(100)	31(81)
<i>ystA</i>	22(67)	2(100)	31(81)
<i>virF</i>	9(28)	-	17(44)
Total	32	2	38

4.2 Duplex-PCR para detecção/identificação de *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3

Com referência a identificação molecular pela Duplex-PCR, todas as amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4 apresentaram tanto a banda do fator *tufA* (marcador do gênero *Yersinia*) quanto a banda do gene *rfbC* (marcador de *Y. enterocolitica* O:3), já as amostras pertencentes aos outros sorotipos analisados, bem como as de outras espécies de *Yersinia*, apresentaram somente o marcador do gênero, demonstrando assim o poder de detecção/identificação desta técnica (Figura 4-1; Tabela 4-5).

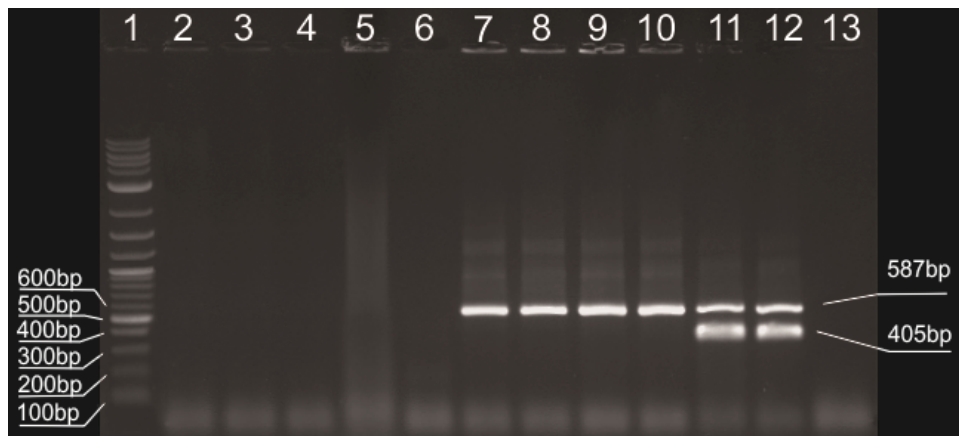


Figura 4-1 - Figura demonstrativa da reação da Duplex-PCR para detecção dos genes *rfbC* (405bp) e *tufA* (587pb). Controles Negativos de 2 a 6; Controles do gênero *Yersinia* de 7 a 10; Controles de *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3 de 11 a 12; Faixa 1 – Padrão de peso molecular 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, USA); Faixa 2 - *Escherichia coli* ATCC 25922; Faixa 3- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 10708; Faixa 4 - *Citrobacter freundii* ATCC 8090; Faixa 5 - *Proteus vulgaris* ATCC 29513; Faixa 6 – *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004; Faixa 7 - *Yersinia kristensenii* CIP 9993; Faixa 8 - *Yersinia frederiksenii* CIP 8029; Faixa 9 - *Yersinia ruckerii* ATCC 29473; Faixa 10 - *Yersinia pseudotuberculosis* IAL 1793; Faixa 11 - *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3 (YE 54); Faixa 12- *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:3 CIP 81.41; Faixa 13 - branco.

Tabela 4-5 – Resultado da Duplex-PCR para amplificação de *tufA* e *rfbC* em todas as amostras de *Yersinia* da CLIST e dos controles negativos.

Espécie	Sorotipo	Fonte/Cepa	Nº de amostras analisadas	Amplificação da banda	
				<i>rfbC</i>	<i>TufA</i>
Cepas de <i>Yersinia</i> da CLIST					
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:1,2,3	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:2,3	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:3	Animal/ Humano	65	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:4	Humano	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:5	Animal/ Humano	4	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:6	Humano	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:7	Humano	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:8	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:18	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:19,8	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:22	Animal	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:47	Animal	1	-	+
Cepas padrões de <i>Yersinia</i>					
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:3	CIP 81.41	1	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:5,27	CIP 106676	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:6,30	CIP 107202	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:8	CIP 80.27T	1	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	O:9	CIP 81.42	1	-	+
<i>Yersinia kristensenii</i>		CIP 9993	1	-	+
<i>Yersinia frederiksenii</i>		CIP 8029	1	-	+
<i>Yersinia ruckerii</i>		ATCC 29473	1	-	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		IAL 1791	1	-	+
Controle Negativo					
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	1	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>		ATCC 10708	1	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC 8090	1	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>		ATCC 29004	1	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>		ATCC 29513	1	-	-

(+) - Positivo para amplificação; (-) - Negativo para amplificação

A Duplex-PCR foi testada com outras enterobactérias, geneticamente relacionadas, para se averiguar a sua especificidade, as amostras padrões testadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 10708, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004 e *Proteus vulgaris* ATCC 29513. E em nenhuma delas foi amplificada a banda do fator *tufA* (Figura 4-1; Tabela 4-5).

A pesquisa BLASTN no banco de dados do NCBI, utilizando o fragmento de *rfbC* sequenciado, revelou uma alta similaridade (97% de identidade nucleotídica) somente com as sequências de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3.

O gene do fator *tufA* de todas as espécies dentro do gênero *Yersinia* presentes no GenBank foi comparado com o *iniciador* para o mesmo fator utilizado no duplex, através do Bioedit version 7.0.9 (Ibis Biosciences). O *iniciador* alinhou com o gene das seguintes espécies: *Y. enterocolitica*, *Y. rohdei*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. ruckerii*, *Y. entomophaga*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii* e *Y. intermedia* (Figura 4-2).

O mesmo alinhamento do parágrafo anterior foi feito com as sequências do gene *tufA* mais similares fora do gênero *Yersinia*, e revelou o alinhamento com as sequências de *Hafnia alvei* e *Obesumbacterium proteus* (Figura 4-3).

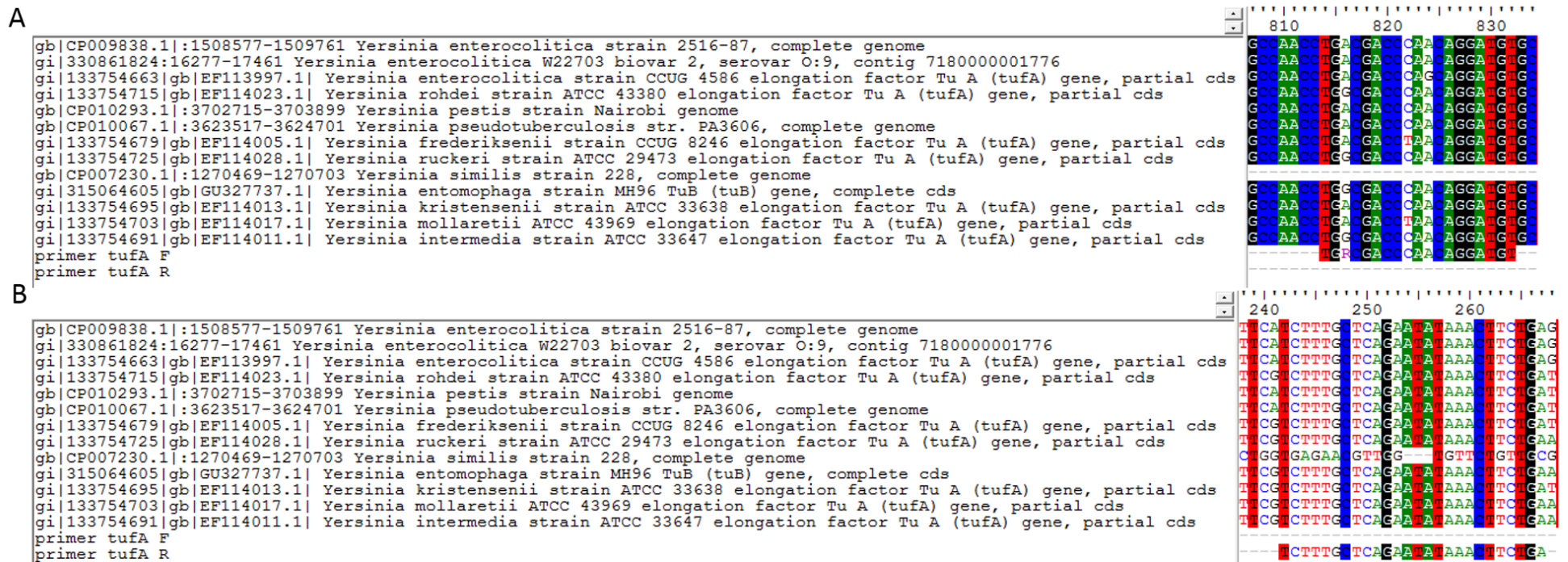


Figura 4-2 – Alinhamento das sequências dos iniciadores *tufA* com as sequências do gene *tufA* mais próximas da sequência da cepa CIP 81.41 dentro do gênero *Yersinia*. A) Alinhamento com o iniciador *forward* do gene *tufA*. B) Alinhamento com o iniciador *reverse* do gene *tufA*. A= adenina; C= citosina; G= guanina; T= timina; R = G ou A

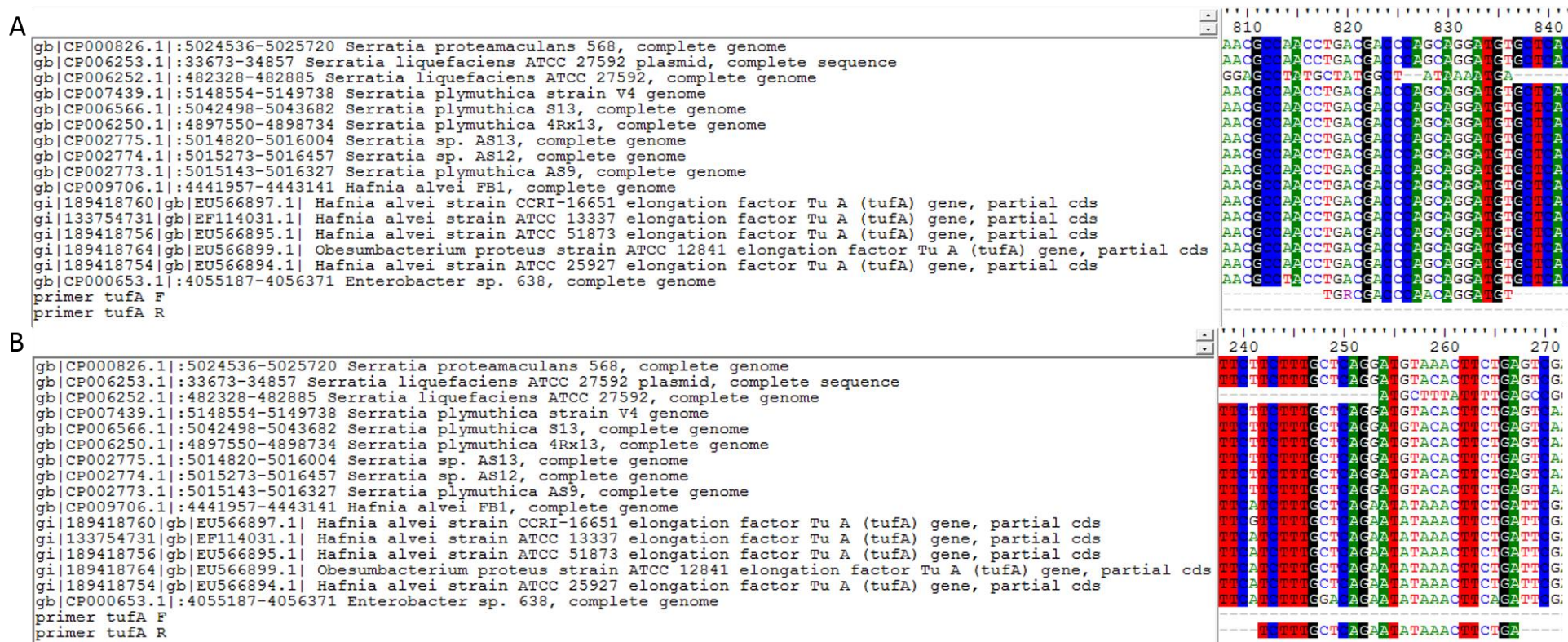


Figura 4-3 - Alinhamento das sequências dos iniciadores *tufA* com as sequências do gene *tufA* mais próximas da sequência da cepa CIP 81.41 fora do gênero *Yersinia*. A) Alinhamento com o iniciador *forward* do gene *tufA*. B) Alinhamento com o iniciador *reverse* do gene *tufA*. A= adenina; C= citosina; G= guanina; T= timina; R = G ou A

4.3 Análise da presença de *Y. enterocolitica* nas fezes pela Duplex-PCR

Os resultados da análise da reação Duplex-PCR e do isolamento em meios de cultura, do crescimento bacteriano proveniente das fezes dos dois grupos, encontram-se na Tabela 4-6. A banda do gene *rflC* do sorotipo O:3 não amplificou em nenhuma das amostras, sugerindo a ausência de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3. Já para a banda do gênero, que amplificou em 14 amostras dentro de cada grupo, revelou pelo teste de qui-quadrado que, $\chi^2 = 0$; IC-95% (0,40 – 2,48); $P > 0,05$ (não foi estatisticamente significativo). Para o teste do O.R., o valor de OR=1, o que significa que não há associação entre a presença de HIV e a probabilidade de ser portadora de *Yersinia*. Ainda, do grupo de Petrópolis, foi possível o isolamento de duas cepas: uma *Y. frederiksenii* e uma *Y. enterocolitica* sorotipo O:7.

Tabela 4-6 – Resultados da Duplex-PCR e do isolamento no crescimento bacteriano das 74 amostras de fezes de cada grupo.

Grupo de Estudo (HIV +)	Duplex		Grupo Controle (Saudável)	Isolamento		
	Amostra	<i>rflC</i>		<i>tufA</i>	Amostra	<i>rflC</i>
IPPMG 01	-	-	PET 01	-	-	-----
IPPMG 02	-	-	PET 02	-	-	-----
IPPMG 03	-	-	PET 03	-	-	-----
IPPMG 04	-	+	PET 04	-	-	-----
IPPMG 05	-	-	PET 05	-	-	-----
IPPMG 06	-	+	PET 06	-	-	-----
IPPMG 07	-	+	PET 07	-	-	-----
IPPMG 08	-	-	PET 08	-	-	-----
IPPMG 09	-	-	PET 09	-	-	-----
IPPMG 10	-	-	PET 10	-	-	-----
IPPMG 11	-	+	PET 11	-	+	-----
IPPMG 12	-	-	PET 12	-	-	-----
IPPMG 13	-	-	PET 13	-	-	-----
IPPMG 14	-	-	PET 14	-	-	-----
IPPMG 15	-	-	PET 15	-	-	-----
IPPMG 16	-	+	PET 16	-	-	-----
IPPMG 17	-	-	PET 17	-	-	-----
IPPMG 18	-	-	PET 18	-	-	-----
IPPMG 19	-	-	PET 19	-	-	-----
IPPMG 20	-	-	PET 20	-	-	-----
IPPMG 21	-	-	PET 21	-	-	-----
IPPMG 22	-	-	PET 22	-	-	-----
IPPMG 23	-	-	PET 23	-	-	-----
IPPMG 24	-	-	PET 24	-	-	-----
IPPMG 25	-	-	PET 25	-	-	-----

Grupo de Estudo (HIV +)			Grupo Controle (Saudável)			Isolamento
Amostra	<i>rflC</i>	<i>tufA</i>	Amostra	<i>rflC</i>	<i>tufA</i>	
IPPMG 26	-	-	PET 26	-	+	>> <i>Y. frederiksenii</i>
IPPMG 27	-	-	PET 27	-	+	-----
IPPMG 28	-	-	PET 28	-	-	-----
IPPMG 29	-	+	PET 29	-	-	-----
IPPMG 30	-	-	PET 30	-	-	-----
IPPMG 31	-	-	PET 31	-	-	-----
IPPMG 32	-	+	PET 32	-	+	-----
IPPMG 33	-	-	PET 33	-	-	-----
IPPMG 34	-	-	PET 34	-	-	-----
IPPMG 35	-	-	PET 35	-	-	-----
IPPMG 36	-	-	PET 36	-	-	-----
IPPMG 37	-	+	PET 37	-	-	-----
IPPMG 38	-	+	PET 38	-	-	-----
IPPMG 39	-	-	PET 39	-	-	-----
IPPMG 40	-	-	PET 40	-	-	-----
IPPMG 41	-	+	PET 41	-	-	-----
IPPMG 42	-	-	PET 42	-	+	-----
IPPMG 43	-	-	PET 43	-	-	-----
IPPMG 44	-	-	PET 44	-	-	-----
IPPMG 45	-	-	PET 45	-	-	-----
IPPMG 46	-	-	PET 46	-	-	-----
IPPMG 47	-	-	PET 47	-	-	-----
IPPMG 48	-	+	PET 48	-	+	>> <i>Y. enterocolitica</i> O:7
IPPMG 49	-	-	PET 49	-	-	-----
IPPMG 50	-	-	PET 50	-	-	-----
IPPMG 51	-	+	PET 51	-	-	-----
IPPMG 52	-	-	PET 52	-	-	-----
IPPMG 53	-	-	PET 53	-	+	-----
IPPMG 54	-	-	PET 54	-	+	-----
IPPMG 55	-	+	PET 55	-	+	-----
IPPMG 56	-	-	PET 56	-	-	-----
IPPMG 57	-	-	PET 57	-	-	-----
IPPMG 58	-	-	PET 58	-	-	-----
IPPMG 59	-	-	PET 59	-	+	-----
IPPMG 60	-	-	PET 60	-	-	-----
IPPMG 61	-	-	PET 61	-	-	-----
IPPMG 62	-	-	PET 62	-	+	-----
IPPMG 63	-	-	PET 63	-	-	-----
IPPMG 64	-	-	PET 64	-	-	-----
IPPMG 65	-	-	PET 65	-	-	-----
IPPMG 66	-	-	PET 66	-	-	-----
IPPMG 67	-	-	PET 67	-	-	-----
IPPMG 68	-	-	PET 68	-	+	-----
IPPMG 69	-	-	PET 69	-	+	-----
IPPMG 70	-	-	PET 70	-	+	-----
IPPMG 71	-	-	PET 71	-	-	-----

Grupo de Estudo (HIV +)			Grupo Controle (Saudável)			Isolamento
Amostra	<i>rflC</i>	<i>tufA</i>	Amostra	<i>rflC</i>	<i>tufA</i>	
IPPMG 72	-	-	PET 72	-	-	-----
IPPMG 73	-	+	PET 73	-	-	-----
IPPMG 74	-	-	PET 74	-	-	-----
Total	0	14(18%)		0	14(18%)	2(2,7%)

(+) - Positivo para amplificação; (-) - Negativo para amplificação; IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira/UFRJ; PET – Petrópolis.

4.4 MLST

Quanto à análise do MLST, os biossorotipos 4/O:3, 2/O:5b, 1A/O:5, 1A/O:6 e 1A/O:4 foram genotipados respectivamente com os STs (*sequence types*) 18, 14, 3, 4 e 170. Este último ST foi descoberto neste estudo, sendo submetido ao banco de dados do PubMLST, recebendo o número 170. A cepa YE 57 do biossorotipo 1A/O:7 também revelou um novo ST, que ainda não foi depositado no banco de dados do PubMLST (Tabela 4-7). Com os dados obtidos foi montada uma árvore filogenética no eBURST, em que se demonstra a correlação filogenética dos STs encontrados com os outros STs descritos (Figura 4-4).

Tabela 4-7 - Correlação entre o *Sequence type* e o biotipo/sorotipo das cepas de *Y. enterocolitica* analisadas.

<i>Sequence Type</i> (ST)	Nº de cepas	Biotipo/Sorotipo
ST18	65	<i>Y.enterocolitica</i> 4/O:3
ST14	2	<i>Y.enterocolitica</i> 2/O:5b
ST3	2	<i>Y.enterocolitica</i> 1A/O:5
ST4	1	<i>Y.enterocolitica</i> 1A/O:6
ST170	1	<i>Y.enterocolitica</i> 1A/O:4
Novo ST	1	<i>Y.enterocolitica</i> 1A/O:7
Total:	72	

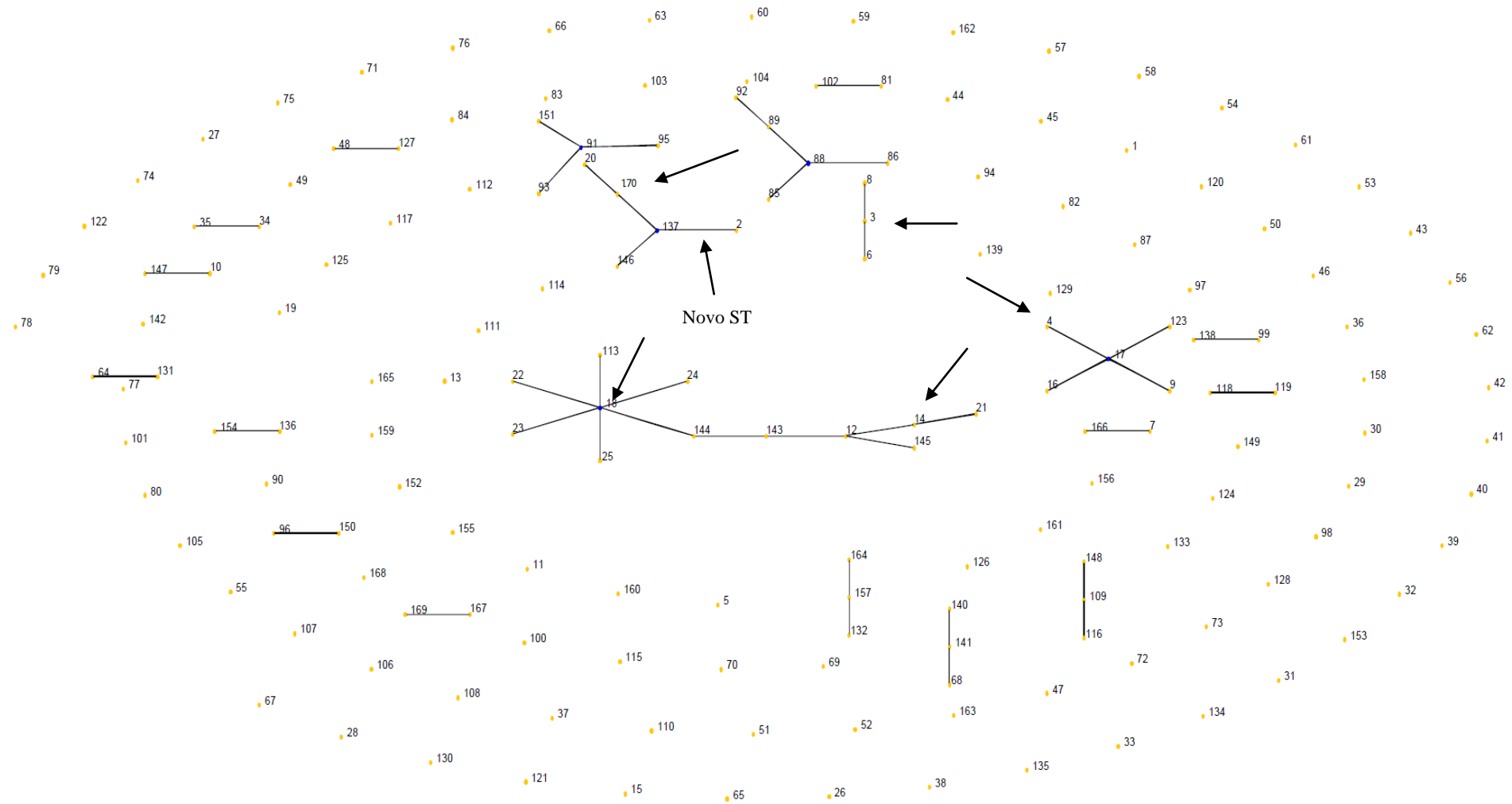


Figura 4-4 - Árvore demonstrando a correlação filogenética de todos os *sequence types* (STs). As setas indicam os STs encontrados, além de indicar a posição do novo ST.

4.5 Sequenciamento de nova geração

O NGS foi realizado com as cinco amostras de *Y. enterocolitica* selecionadas e seus dados genômicos encontram-se na Tabela 4-8. Os genes de resistência aos antimicrobianos e os principais genes de virulência encontrados nas amostras estão expostos na Tabela 4-9. Um mapa genético foi construído para demonstrar a localização de cada gene de virulência, tendo o genoma da YE 19 como modelo (Figura 4-5). Na YE 54, foi encontrado um plasmídio que apresentou 98% de similaridade, quanto à sequência de nucleotídeos, com o plasmídio pSTU288-2. O resultado para os antibióticos que esse plasmídio confere resistência, seguindo o CLSI (2017), foram: sensível para cloranfenicol e gentamicina e resistente para estreptomicina e tetraciclina.

Tabela 4-8 - Dados genômicos das cinco amostras de *Y. enterocolitica* analisadas.

Métrica	Amostras				
	YE 51	YE17	YE 19	YE 54	CIP 81.41
Sorotipo	O:5	O:3	O:3	O:3	O:3
Fonte de isolamento	Humano	Suíno	Humano	Humano	Padrão
Comprimento Total (pb)	4706711	4456000	4550059	4467636	4400663
scaffolds	39	127	19	123	120
contigs	39	127	135	123	120
4N50	259400	710003	620817	710003	624280
GC (%)	47.08	46.96	47	46.99	46.93
Genes (total)	4349	4165	4138	4182	4101
CDS (total)	4255	4029	4034	4045	3972
rRNAs	8	4	8	8	8
tRNAs	80	73	73	71	74
ncRNAs	93	93	90	93	91
Pseudo Genes (total)	94	136	177	137	129

Tabela 4-9 - Genes de virulência e resistência encontrados nas amostras de *Y. enterocolitica* analisadas.

Tipo	Gene	Cepa					Função
		YE 51	YE 17	YE 19	YE 54	CIP 81.41	
R	blaA	+	+	+	+	+	Betalactamase
R	vat(F)	+	+	+	+	+	Resistência a estreptogramina
V	ail	-	+	+	+	+	Proteína de ancoragem ao locus de invasão
V	cheA	+	+	+	+	+	Proteína CheA de quimiotaxia
V	cheB	+	+	+	+	+	Metil-esterase CheB específica da quimiotaxia
V	cheD	+	+	+	+	+	Proteína aceptora de metil CheD da quimiotaxia
V	cheR	+	+	+	+	+	Metiltransferase CheR da quimiotaxia
V	cheW	+	+	+	+	+	Proteína de ligação a purina CheW da quimiotaxia
V	cheY	+	+	+	+	+	Proteína CheY reguladora da quimiotaxia
V	cheZ	+	+	+	+	+	CheZ regulador da quimiotaxia
V	flgA	+	+	+	+	+	Proteína flagelar basal de biossíntese do anel-P
V	flgB	+	+	+	+	+	Proteína FlgB da haste do corpo basal flagelar
V	flgC	+	+	+	+	+	Proteína FlgC da haste do corpo basal flagelar
V	flgD	+	+	+	+	+	Proteína de modificação da haste do corpo basal flagelar
V	flgE	+	+	+	+	+	Proteína FlgE do gancho flagelar
V	flgF	+	+	+	+	+	Proteína flgF da haste do corpo basal flagelar
V	flgG	+	+	+	+	+	Proteína FlgG da haste do corpo basal flagelar
V	flgH	+	+	+	+	+	Proteína do anel-L do corpo basal flagelar
V	flgI	+	+	+	+	+	Proteína do anel-P do corpo basal flagelar
V	flgJ	+	+	+	+	+	Proteína componente da haste flagelar / muramidase flgJ
V	flgK	+	+	+	+	+	Proteína FlgK associada ao gancho flagelar
V	flgL	+	+	+	+	+	Proteína FlgL associada ao gancho flagelar
V	flgM	+	+	+	+	+	FlgM fator anti-sigma28
V	flgN	+	+	+	+	+	Proteína FlgN de síntese flagelar
V	flhA	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese flhA
V	flhB	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese flhB
V	flhC	+	+	+	+	+	Ativador transcricional FlhC
V	flhD	+	+	+	+	+	Ativador transcricional flagelar
V	flhE	+	+	+	+	+	Precursor da proteína flagelar FlhE
V	fliA	+	+	+	+	+	Biossíntese do fator flagelar sigma
V	fliB	+	+	+	+	+	Flagelina lisina-N-metiltransferase
V	fliC	+	+	+	+	+	Flagelina
V	fliD	+	+	+	+	+	Proteína capsular flagelar
V	fliE	+	+	+	+	+	Proteína FliE do gancho do corpo basal flagelar
V	fliF	+	+	+	+	+	Proteína flagelar do anel-MS
V	fliG	+	+	+	+	+	Proteína G do motor flagelar
V	fliH	+	+	+	+	+	Proteína H componente flagelar
V	fliL	+	+	+	+	+	Síntese do ATP específico do flagelo
V	fliJ	+	+	+	+	+	Chaperona da biosíntese flagelar
V	fliK	+	+	+	+	+	Proteína FliK de controle do comprimento do gancho flagelar
V	fliL	+	+	+	+	+	Proteína flagelar associada ao corpo basal FliL
V	fliM	+	+	+	+	+	Proteína FliM do motor flagelar

Tipo	Gene	Cepa					Função
		YE 51	YE 17	YE 19	YE 54	YE 81.41	
V	fliN	+	+	+	+	+	Proteína flagelar motora FliN
V	fliO	+	+	+	+	+	Proteína flagelar FliO
V	fliP	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese fliP
V	fliQ	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese FliQ
V	fliR	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese fliR
V	fliS	+	+	+	+	+	Proteína flagelar FliS
V	fliT	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese FliT
V	fliZ	+	+	+	+	+	Proteína flagelar de biossíntese FliZ
V	hemP	-	+	+	+	+	Proteína de captação de heme
V	hemR	-	+	+	+	+	Precursor do receptor de heme
V	hemS	-	+	+	+	+	Proteína transportadora de heme
V	hemT	-	+	+	+	+	Proteína periplasmática de ligação ao heme
V	hemU	-	+	+	+	+	Proteína HmuU da permease do sistema de transporte de heme
V	hemV	-	+	+	+	+	Subunidade ligadora-ATP importadora de heme
V	inv	+	+	+	+	+	Invasina
V	motA	+	+	+	+	+	Proteína MotA do motor flagelar
V	motB	+	+	+	+	+	Proteína MotB do motor flagelar
V	myfB	+	+	+	+	+	Chaperona
V	myfC	+	+	+	+	+	Proteína arrumadora de membrana externa
V	myfE	+	+	+	+	+	Suposta proteína reguladora
V	myfF	+	+	+	+	+	Proteína hipotética
V	pla	+	+	+	+	+	Peptidase A26 omptin
V	psaA	-	+	+	+	+	Precursor do antígeno pH 6
V	YE105_C0173	+	+	+	+	+	Proteína WzzE da biossíntese do lipopolissacarídeo
V	YE105_C0309	+	+	+	+	+	Suposto regulador de resposta de dois componentes
V	YE105_C0310	+	+	+	+	+	Histidina quinase híbrida com múltiplos sensores
V	YE105_C0312	+	+	+	+	+	Proteína externa da família YscC/HrcC formadora do poro do T3SS
V	YE105_C0313	+	+	+	+	+	Proteína do T3SS
V	YE105_C0314		+	+	+	+	Aparato do T3SS
V	YE105_C0323	+	+	+	+	+	Regulador transcricional da família AraC
V	YE105_C0324	+	+	+	+	+	Aparato do sistema de secreção
V	YE105_C0325	-	+	+	+	+	Aparato do T3SS
V	YE105_C0326	+	+	+	+	+	Proteína hipotética
V	YE105_C0327	+	+	+	+	+	Lipoproteína do aparato T3SS
V	YE105_C0328	+	+	+	+	+	Proteína hipotética
V	YE105_C0329	+	-	-	-	-	Proteína da família HrpE/YscL do aparato T3SS
V	YE105_C0332	+	+	+	+	+	Proteína ssaV do aparato do sistema de secreção
V	YE105_C0333	+	+	+	+	+	ssaN ATP sintetase do aparato do sistema de secreção
V	YE105_C0334	+	+	+	+	+	Proteína do aparato T3SS
V	YE105_C0335	+	+	+	+	+	Proteína hipotética
V	YE105_C0336	+	+	+	+	+	Proteína do aparato T3SS
V	YE105_C0338	+	+	+	+	+	Proteína da família YscR/HrcR do aparato T3SS
V	YE105_C0339	+	+	+	+	+	Proteína do T3SS
V	YE105_C0340	+	+	+	+	+	Componente EscT do caminho de T3SS
V	YE105_C0341	+	+	+	+	+	Proteína da família YscU/HrpY do T3SS
V	YE105_C0912	+	+	+	+	+	Proteína D do caminho geral de secreção

Tipo	Gene	Cepa					Função
		YE 51	YE 17	YE 19	YE 54	YE 81.41	
V	YE105_C1175	+	+	+	+	+	translocase
V	YE105_C1176	+	+	+	+	+	Proteína WbcK
V	YE105_C1177	-	+	+	+	+	Proteína WbcL
V	YE105_C1178	+	+	+	+	+	Proteína WbcM
V	YE105_C1179	+	+	+	+	+	Proteína WbcN
V	YE105_C1180	+	+	+	+	+	Fosfato de poliprenol: N-acetil-hexosamina 1-fosfato-transferase
V	YE105_C1181	+	+	+	+	+	Proteína TrsG like
V	YE105_C1182	+	+	+	+	+	Suposta glicosiltransferase
V	yplA	+	+	+	+	+	Fosfolipase A
V	yst1C	+	+	+	+	+	Proteína C do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1E	+	+	+	+	+	Proteína E do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1F	+	+	+	+	+	Proteína F do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1G	+	+	+	+	+	Proteína G do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1J	+	+	+	+	+	Proteína J do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1K	+	+	+	+	+	Proteína K do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1L	+	+	+	+	+	Proteína L do caminho geral de secreção (T2SS)
V	yst1O	+	+	+	+	+	prepilina peptidase (T2SS)
V	ystA	-	+	+	+	+	Enterotoxina

(+) – Presença do gene; (-) – Ausência do gene; R- Resistência aos antimicrobianos; V- Virulência; T2SS- Sistema de secreção do tipo II; T3SS- Sistema de Secreção do tipo III.

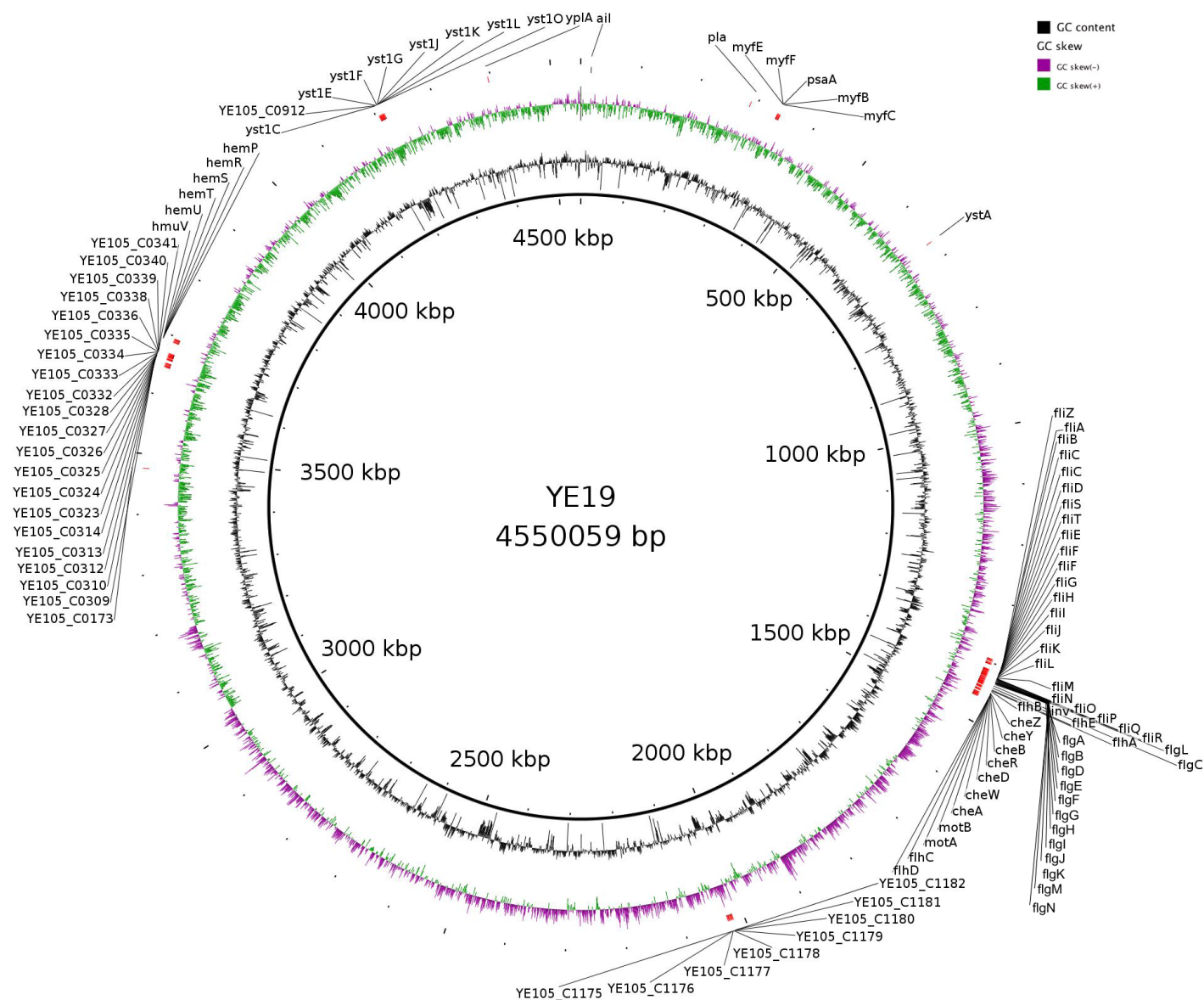


Figura 4-5 - Mapa genético da YE 19 demonstrando a localização de cada gene de virulência em seu genoma.

4.6 Proteômica

Foram identificadas um total de 1.420 proteínas na amostra YE 54, distribuídas pelas principais categorias da ontologia gênica (processo biológico, função molecular e componente celular), além das que não foram classificadas em nenhuma dessas categorias. Como o foco desse estudo foi a virulência e resistência aos antimicrobianos, portanto as proteínas que foram analisadas encontram-se dentro dos dois parâmetros. Assim, na Tabela 4-10 verifica-se as principais proteínas identificadas dentro do escopo previamente determinado.

Quanto à análise da expressão de proteínas, foi utilizada a concentração de cada proteína encontrada por amostra, para se diferenciar a expressão nas duas temperaturas de análise, à temperatura ambiente (28°C) e a 37°C. Foram reconhecidas 60 proteínas que variaram significativamente nas duas temperaturas, sendo em sua maioria às proteínas envolvidas na transcrição, tradução e metabolismo bacteriano. Seguindo os parâmetros anteriores, a virulência e a resistência aos antimicrobianos, às proteínas de maior relevância, que variaram, localizam-se na Tabela 4-11.

Tabela 4-10 - Principais proteínas de virulência e resistência identificadas na amostra YE 54 (O:3/4 – humana).

Proteína	Gene	Função
Fator de alongamento Tu 2	tuf2	Fator de alongamento 2
Proteína reguladora da absorção de zinco	zur	Captação de zinco
Enzima fotoreativadora	phrB	Reparo do DNA danificado por UV
Proteína B do sistema UvrABC (Proteína UvrB)	uvrB	Reparo do DNA danificado por UV
Proteína de proteção do DNA durante a falta de recursos (EC 1.16)	dps	Resposta ao estresse (proteção do DNA contra a toxicidade do ferro)
Proteína fosfatase CheZ	cheZ	Quimiotaxia
Protease Lon (EC 3.4.21.53) (Protease La ATP-dependente)	lon	Resposta ao estresse (proteção do DNA, eliminação de proteínas anormais)
Proteína 7 de ligação da penicilina	pbpG	Síntese do peptidoglicano
Glutarredoxina	grxD	defesa contra o estresse oxidativo
Piruvato quinase (EC 2.7.1.40)	pykF	Degradação do carboidrato
Proteína de estresse universal	uspC	Resposta ao estresse
Proteína de ligação da penicilina ativadora de LpoA (PBP ativador de LpoA)	lpoA	biossíntese do peptidoglicano
Componente EfeO do sistema de captação de ferro	efeO	Captação do ferro
Carboximetiltransferase U34 tRNA (EC 2.5.1.-)	cmoB	Homeostasia do íon cobre
Proteína 6 de ligação da penicilina	dacC	Maturação e forma da parede celular
Proteína E de estresse universal	uspE	Resposta ao estresse
Receptor FcuA do ferricromo	fcuA	Transporte sideróforo (ferro)
Proteína F reguladora do Quorum-sensing.	qseF	Comunicação celular bacteriana
Proteína ArnA bifuncional de resistência a polimixina	arnA	Descarboxilação oxidativa
Porina ompK36	ompC	Resistência e virulência
Proteína 4 de ligação da penicilina	dacB	Actividade da carboxipeptidase de tipo serina
Proteína periplasmática de ligação ao Ferro(III)	fbpA	Captação do ferro
Proteína de resposta ao estresse	LC20_00451	Resposta ao estresse
Proteína Flavohemo (Flavohemoglobina) (proteína tipo Hemoglobina) (óxido nítrico dioxigenase)	hmp	Resposta a alta concentração de óxido nítrico
Tiorredoxina	trxA	Homeostasia Redox
Modulador of drug activity B	mdaB	Proteção contra as quinonas
Bomba FieF de efluxo de cation Cation-efflux pump	fieF	Transporte de ferro ferroso
Superoxido dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	sodC1	Catalisa a dismutação do superóxido
Proteína tipo estresse osmótico	LC20_00111	Resposta ao estresse oxidativo

Proteína	Gene	Função
Proteína LptD de montagem do LPS	lptD	Transporte do LPS
Ferroquelatase (EC 4.99.1.1) (síntese de heme)	hemH	Biossíntese de heme
Proteína HemY	hemY	Processo metabólico de heme
Proteína 5 de ligação da penicilina	dacA	Atividade de carboxipeptidase D-Ala-D-Ala do tipo serina
Subunidade TolC da bomba de efluxo Multidroga	tolC	Transporte e resistência
Proteína de membrana extrema W	ompW	Resistência a fagocitose
Metaloprotease dependente de zinco (EC 3.4.24.-)	rseP	Atividade metaloendopeptidase
Proteína B de resistência à acridina	acrB	Transporte
Catalase	katA	Decompõe o peróxido de hidrogênio
Fator anti-sigma-28	flgM	regulador transcricional
Glutarredoxina-3	grxC	Homeostasia Redox
Proteína 1B de ligação da penicilina (PBP-1b) (PBP1b)	mrcB	Organização da parede celular
Proteína EmrA exportadora de multidroga	emrA	Transporte e resistência
Proteína MdlA de ligação ao ATP do tipo resistência a multidrogas	mdlA	Transporte e ATPase
Proteína 2 de ligação da penicilina	mrda	Se ligar a penicilina
Proteína D de resistência a acriflavina	acrD	Transporte e resistência
Proteína TabA toxina-antitoxina do biofilme	tabA	Formação do biofilme
Proteínas HemS de transporte da hemina	hemS	Transporte do íon ferro
Fator de alongamento Tu 1	tuf1	Fator de alongamento 1
Invasina	invA	Aderência e invasão
Proteína UreG acessória de urease	ureG	Catalisa a hidrólise da uréia
Subunidade gamma da urease	ureA	Degradação da uréia
Regulador de utilização de ácido siálico, família RpiR	Y11_25601	regulador transcricional
Subunidade alpha da Urease	ureC	Degradação da uréia
Proteína externa de membrana F	ompF	Tipo porina
Proteína externa de membrana C	ompC	Tipo porina
Proteína externa de membrana C2	ompC2	Tipo porina
Proteína UreF acessória de urease	ureF	Degradação da uréia
Proteína externa de membrana X	ompX	Parede celular/biogênese da membrana

Proteína	Gene	Função
Proteína UreD acessória de urease	ureD	Maturação da via da urease
Betalactamase	blaA	Resistência aos betalactâmicos
Proteína do canal de próton da família Mota/TolQ/ExbB	Y11_18501	Atividade transportadora
Proteína externa de membrana A	ompA	Parede celular/biogênese da membrana

Tabela 4-11 - Principais proteínas que tiveram sua expressão modificada pela temperatura na amostra YE 54.

Proteína	Gene	Maior ou menor expressão a 37°C	Concentração pmol/mg média T.A.	Concentração pmol/mg média 37°C
Proteína bifuncional ArnA de resistência a polimixina	arnA	Menor	0,0254882	0,0107830
Protease Do	degP	Maior	0,0341561	0,1060525
Chaperonina 60 kDa(Proteína GroEL) (Proteína Cpn60)	groL groEL	Maior	0,7058313	1,4229566
Proteína HtpG chaperona (proteína HtpG do choque térmico)	htpG	Maior	30,4502	97,6104

T.A. – Temperatura ambiente (28°C).

5 DISCUSSÃO

Diante de tudo que foi exposto, e tendo em vista que *Y. enterocolitica* é um enteropatógeno pouco estudado no Brasil, acreditamos que este projeto a partir de uma abordagem molecular detalhada, seja o gatilho para ampliação do estudo deste patógeno em nosso meio.

A PCR para os genes de virulência revelou uma frequência de 80% para o *inv*, 76% para o *ail*, 76% para o *ystA* e 36% para o *virF* (Tabela 4-2). Estes resultados estão de acordo com a literatura, na qual o gene *inv* é encontrado com maior frequência que os demais, tanto no Brasil quanto no mundo (FALCÃO et al., 2006; ZHENG et al., 2007; RUSAK et al., 2014). As amostras do sorovar O:3 biotipo 4 que apresentaram todos os genes de virulência foram 26 (40%) (Tabela 4-3), sendo 9 (28%) de suíno e 17 (44%) de humanos (Tabela 4-4). A presença destes fatores em 40% das amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4 pode ser considerada baixa quando comparada com os de outros estudos como os de Falcão e colaboradores. (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 Zheng e colaboradores (2008) que demonstraram uma taxa de 100% para o *inv*, 94% para o *ail*, 93% para o *ystA* e 82% para o *virF* em pacientes com diarreia. No entanto, mesmo com uma taxa menor, quando confrontado aos demais trabalhos, ainda assim se constitui na quantidade considerável, principalmente tratando-se de um patógeno relacionado a uma infecção zoonótica de importância (FÀBREGA; VILA, 2012). Estes resultados corroboram com a literatura internacional, indicando o caráter cosmopolita do suíno como a mais importante fonte de infecção de *Y. enterocolitica* O:3/4 carreadoras de genes de virulência (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006b; PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014).

Vinte nove amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4 tanto de origens humana como animal apresentaram somente os genes cromossomiais *ail*, *ystA* e *inv* e não o plasmidial *virF* (Tabela 4-1). Uma das hipóteses para tal fato pode ter sido a perda do plasmídio, instável a variação de temperatura e a sucessivos repiques (ZHENG et al., 2008). No presente estudo, admite-se a interferência do longo armazenamento das amostras a 4° C na coleção do laboratório (CLIST).

Doze amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4, tanto de origem humana como animal, não apresentaram nenhum dos genes avaliados (Tabela 4-1). A literatura evidencia casos de cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas que não carregam genes de virulência tradicionais, no entanto, podem carrear outros genes de virulência não conhecidos ou que não tenham sido estudados

(ZHENG et al., 2008). E ainda há a hipótese de estes genes cromossomiais terem sido perdidos, embora, trata-se de um evento muito mais raro que a perda do plasmídeo (ZHENG et al., 2008).

Das cinco amostras pertencentes ao biotipo 1A (as do sorotipo O:4, O:5, O:6 e O:7 de origem humana) apenas as dos sorotipos O:4 e O:5 apresentaram o gene cromossomal *inv* (Tabela 4-1). Conquanto a presença do gene *inv* tenha sido confirmada nas amostras, é possível admitir que nas cepas desse biotipo ele não seja funcional (PERUZY et al., 2017). Por outro lado, a presença deste gene em três das cinco as amostras do biótipo 1A está de acordo com outros achados no Brasil (FALCÃO et al., 2006; PAIXÃO et al., 2013b) e no mundo (KRAUSHAAR et al., 2011; PERUZY et al., 2017), reforçando a hipótese de que os representantes do biotipo são capazes de desencadear infecções.

Quanto à amostra do biotipo 2, sorovar O:5b, consigna-se à presença de todos os genes cromossomiais de virulência (genes *inv*, *ail* e *ystA*) (Tabela 4-1). A ocorrência de todos os genes de virulência na amostra se compatibiliza com seu potencial patogênico, retratado pelo seu isolamento de processos diarreicos humanos no Brasil. Todavia na presente investigação, os isolados são de procedência animal, especulando-se que o veículo aquoso tenha se tornado o processo de propagação de *Y. enterocolitica* para o homem e o animal. Na análise realizada, as amostras eram provenientes de fígado de sagui (FRAZÃO; FALCÃO, 2015).

No que tange a Duplex-PCR com os iniciadores para o fator *tufA* e o gene *rfbC*, todas as 88 amostras de *Yersinia* analisadas apresentaram a amplificação da banda do gênero *tufA* (Tabela 4-5). O resultado se coaduna com os de Isabel *et al.* (2008), que salientam que o gene pode ser um alvo útil, em termos de diagnóstico, para identificação de espécies de *Yersinia*. A amplificação do fragmento de 405 bp *rfbC*, somente nas amostras de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, demonstrou que esse gene é um excelente marcador do sorotipo O:3 para finalidade de diagnóstico, corroborando com os achados de Weynants et al. (1996).

Observa-se que a técnica foi capaz de detectar os outros sorotipos de *Y. enterocolitica*, compreendendo todos aqueles que causam doença nos animais e no homem (DRUMMOND et al., 2012) (Tabela 4-5). Além disso, foi capaz de evidenciar outras espécies de *Yersinia* como: *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. ruckerii* e a *Y. pseudotuberculosis*. Vale salientar que os controles negativos utilizados não revelaram reação cruzada, resultado que reforça a utilização desta técnica para detecção de *Yersinia* enteropatogênica (Tabela 4-5).

A alta similaridade revelada pela pesquisa BLASTN do fragmento sequenciado de *rfbC* com as sequências de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 do banco de dados do NCBI (97% de identidade nucleotídica), estão em consonância com os resultados da Duplex-PCR,

confirmando a especificidade deste gene para a detecção/identificação deste sorotipo (WEYNANTS et al., 1996). O gene *rfbC*, localizado no *cluster rfb*, está envolvido nos processos de colonização e invasão, uma vez que é responsável pela biossíntese da cadeia O do antígeno somático no LPS das amostras patogênicas de *Y. enterocolitica* (ASADISHAD et al., 2013).

Na análise do alinhamento dos iniciadores de *tufA* com as sequências do mesmo gene no gênero *Yersinia* (sequências com identidade nucleotídica acima de 90%), o genoma da *Yersinia similis* strain 288 não apresentou a região que alinha com o iniciador *forward* (Figura 4-2 A). Já a parte do genoma desta amostra que alinhou com iniciador *reverse* demonstrou uma grande divergência quanto à sequência de nucleotídeos. A grande variação genética pode ser explicada pela distância evolutiva existente entre *Y. enterocolitica* e *Y. similis* dentro do gênero *Yersinia*. Estudos de sequenciamento de genoma completo colocaram as duas espécies em ramos antagônicos dentro da árvore filogenética do gênero (REUTER et al., 2014).

As sequências de *tufA* das amostras *Y. enterocolitica* strain CCUG 4586, *Y. frederiksenii* strain CCUG 8246 e *Y. mollaretii* ATCC 43969 demonstraram apenas a diferença de um único nucleotídeo com a sequência do iniciador *forward* (Figura 4-2 A). O polimorfismo de nucleotídeo único é esperado para o gene *tufA*, o qual possui níveis intragenômicos de identidade de ácidos nucléicos que vão de 83.8% a 91.7% entre as cepas de *Yersinia* (ISABEL et al., 2008). Ainda, com exceção da *Y. similis* strain 288, todas as outras sequências apresentaram 100% de identidade nucleotídica com o iniciador *reverse* (Figura 4-2 B).

Os genomas de *Y. pestis* strain Nairobi e *Y. pseudotuberculosis* strain PA3606 apresentaram uma similaridade nucleotídica de 100% com as sequências dos dois iniciadores (Figura 4-2 A e B). Este resultado em conjunto com o dado da amplificação da banda de *tufA* na PCR da cepa de *Y. pseudotuberculosis* IAL1791 (Tabela 4-5), sugerem que a técnica é capaz de detectar todas as três espécies de *Yersinia* patogênicas para o homem.

Nove sequências apresentaram 100% de similaridade nucleotídica com o par de iniciadores (Figura 4-2 A e B). Todos os resultados indicam que a Duplex-PCR pode ser capaz de detectar: *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 e outros, além de, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei*, *Y. entomophaga*, *Y. mollaretii*, *Y. intermedia*, *Y. ruckerii*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*.

O alinhamento dos iniciadores de *tufA* com a sequências do mesmo gene, fora do gênero *Yersinia* (sequências com identidade nucleotídica acima de 80%), demonstrou uma alta similaridade nucleotídica entre a sequência do iniciador *forward* e as sequências das amostras *Serratia proteamaculans*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Serratia* spp.,

Hafnia alvei, *Obesumbacterium proteus* e *Enterobacter* spp. (Figura 4-3 A). Embora os iniciadores de *tufA* tenham sido desenhados de uma região altamente conservada deste gene dentro do gênero *Yersinia*, as duas cópias do gene *tuf* (*tufA* e *tufB*) existentes, encontrados nas outras enterobactérias, apresentam um alto nível de similaridade, revelando sequências de ácidos nucleicos que podem diferir menos de 1.4% (PARADIS et al., 2005; ISABEL et al., 2008; DALMASSO et al., 2014). No entanto, o gene *tuf* ainda representa um bom alvo para a diferenciação de enterobactérias fenotipicamente semelhantes pertencentes a diferentes espécies (PARADIS et al., 2005).

No que tange o iniciador *reverse* de *tufA*, somente *H. alvei* e *O. proteus* demonstraram alta similaridade nucleotídica (Figura 4-3 B). Isabel e colaboradores (2008) conduziram um estudo filogenético, no qual, construíram árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas de *tufA* e *tufB* para as amostras dentro do gênero *Yersinia* e as enterobactérias fora do gênero. Este estudo demonstrou que membros do clado *H. alvei* e *O. proteus* exibiam um nível intermediário de divergência intragenômica de sequências de *tufA* em comparação com gênero *Yersinia* e as outras enterobactérias. Ainda, a análise do sequenciamento do gene rRNA 16S demonstrou que *H. alvei* é o membro da família *Enterobacteriaceae* mais próximo do gênero *Yersinia*, fato este que pode explicar o resultado do alinhamento (IBRAHIM et al., 1993).

Os resultados das análises sugerem que a técnica da Duplex-PCR pode ser uma ferramenta útil para detecção, e em menor nível identificação, de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, uma vez que ocorra a amplificação das duas bandas (Figura 4-1). No caso da amplificação da banda do gênero (fragmento de *tufA*), sugere que a amostra ou a cepa analisada possa ser *Y. enterocolitica* de outro sorotipo ou até mesmo uma outra espécie de *Yersinia*. Assim sendo, é recomendado a utilização de outras técnicas de identificação, para se evitar uma reação cruzada com *H. alvei* e *O. proteus*.

Diversos métodos de detecção e identificação de *Yersinia* utilizando o sequenciamento têm sido desenvolvidos e apresentam bons resultados, no entanto, as técnicas são bem mais demoradas e caras do que uma simples reação de PCR (NEUBAUER et al., 2000a; DALMASSO et al., 2014).

Sistemas de detecção e identificação baseados nos genes *tufA* e *rfbC* demonstram várias vantagens frente aos sistemas que utilizam como alvos genes de virulência cromossômicos ou plasmidiais: *ail*, *inv*, *yst*, *yadA* e *virF* (JOURDAN et al., 2000; ARNOLD et al., 2001; THOERNER et al., 2003; YE et al., 2014). Aliás, como o observado neste próprio estudo e na literatura, algumas cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas podem ser portadoras de outros genes de virulência que não os analisados, sem falar de alguns representantes do biótipo 1A

desprovidos destes genes, e assim acarretando um resultado falso negativo. Contudo, estes genes são conservados em cepas patogênicas e não patogênicas de *Yersinia*, detectando as cepas mesmo elas não sendo portadoras destes genes de virulência.

Esta metodologia provou ser de fácil realização e muito mais rápida que a detecção por cultivo, podendo ser realizada em qualquer laboratório que tenha o aparato para realização de reações de PCR. Uma vez que a identificação bioquímica clássica proposta por Mollaret e colaboradores (1990), pode demorar em média seis dias para a confirmação da identificação do microrganismo, sem levar em conta a ocorrência de um resultado inconclusivo no perfil bioquímico. Já com a utilização da Duplex-PCR, a identificação pode ser obtida em até dois dias, tempo muito útil em casos de infecções graves, cuja identificação rápida do agente etiológico pode determinar o sucesso do tratamento. Exemplifica-se em analogia ao relato anterior que a identificação das amostras YE 52, 53, 54 e 55 de 2015 (sendo as primeiras a serem analisadas com a Duplex-PCR) (Tabela 4-1) foram feitas pela bioquímica clássica, e em paralelo foi realizada a técnica da Duplex-PCR, obtendo-se o mesmo resultado em apenas dois dias.

Como principal conclusão sobre a reação de Duplex-PCR desenvolvida, cita-se que foi elaborada com o intuito de ser um método rápido, barato e fácil, de triagem de amostras, capaz de detectar *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, outros sorotipos, além de outras espécies de *Yersinia*, diretamente do DNA total extraído de um espécime. A técnica pode ser utilizada para identificação de *Y. enterocolitica* O:3/4, no caso de já se ter um isolado. No entanto, no caso da identificação de outros sorotipos de *Y. enterocolitica* e de outras espécies de *Yersinia*, outros passos de identificação são necessários.

Na análise da presença de *Yersinia* nas fezes das pacientes grávidas HIV positivas do IPPMG/UFRJ e grávidas saudáveis de Petrópolis, utilizou-se a técnica da Duplex-PCR, além da metodologia clássica de isolamento em meio de cultura. Os grupos foram escolhidos para o estudo, pois visava-se observar a influência da imunodeficiência adquirida em grávidas, mais a baixa na imunidade pela gravidez, poderiam tornar a mulher mais susceptível a ser portadora de *Yersinia*.

Estudos sobre a análise de *Yersinia* em grávidas são raros na literatura e focam, mais comumente, a análise por anticorpos circulantes de *Yersinia*. Salientando-se a pesquisa na Dinamarca, no período de 1996 a 2002, quando foi avaliado nas grávidas, que trabalhavam diretamente com animais, o nível de anticorpos IgG, IgM e IgA contra *Yersinia*, resultando na acentuada predominância da fração IgG (KANTSØ et al., 2014).

Os principais dados obtidos da infecção por *Y. enterocolitica* na fase gestacional, resultaram do modelo animal. A infecção experimental de *Y. enterocolitica* sorotipo 6,30

(isolado de feto abortado de cabra) revelou placentite. As alterações patológicas de maior expressão além da placentite bacteriana aguda necrosante foi infecção sistêmica do feto (CORBEL et al., 1992).

Outro estudo de infecção experimental de *Y. enterocolitica* (com cepa isolada de feto abortado de suíno) foi realizado na Polônia em 2009. No caso, foram observadas as lesões histopatológicas causadas na evolução da infecção em porcas nas fases gestacionais de 33, 54 e 89 dias. As lesões anatomo-histopatológicas foram mais intensas no grupo das fêmeas na fase final da gravidez e nos fetos na mesma fase. Quando comparados os grupos infectados com o grupo controle, as diferenças anatomopatológicas das lesões sugeriram que o período da gravidez, na qual foi adquirida à infecção, tem influência direta no curso da yersiniose em suínos (PLATT-SAMORAJ et al., 2009).

Quanto à análise do isolamento por meio de cultura, apresentou o isolamento de uma *Y. frederiksenii* e uma *Y. enterocolitica* sorotipo O:7 apenas no grupo controle, representando 2,7% do total de amostras (Tabela 4-6). O isolamento de representantes deste gênero em amostras clínicas, de alimentos e ambientais não é uma tarefa fácil (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Soma-se a isso, a já mencionada anteriormente, característica de *Y. enterocolitica* de permanecer viável num meio, mas não cultivável (ALEXANDRINO et al., 2004).

Nos estudos que realizaram coprocultivo em meios de cultura, foram demonstradas as taxas baixas de recuperação de *Yersinia* como em Zheng e colaboradores (2008), quando analisaram 2600 amostras fecais, obtiveram 160 isolados (6%) de *Y. enterocolitica*. Em 2007, Zheng e colaboradores, em outro estudo, de um total de 700 amostras de fezes, isolaram 54 cepas de *Y. enterocolitica*, dando uma taxa de prevalência aproximada de 7,5%. A taxa de prevalência de 2,7% deste estudo conseguiu ser menor ainda que as taxas de prevalência dos estudos mencionados anteriormente. Acreditamos que esse resultado possa ser justificado devido ao pequeno número de amostras analisadas, se comparadas com o número de amostras dos outros trabalhos.

Quando analisamos o não isolamento de nenhuma cepa de *Yersinia* do grupo de estudo (Grávidas HIV +) (Tabela 4-6), levantamos a hipótese de que esse resultado possa ser em decorrência da melhora imunológica, frente às infecções secundárias, observada em pacientes sob tratamento com o coquetel anti-HIV. Estudos realizados no Canadá, Europa e EUA demonstraram uma queda acentuada na morbidade e mortalidade de pacientes que passaram a fazer uso de uma terapia antirretroviral (*highly active antiretroviral therapy*). Ainda, os trabalhos demonstraram o declínio de infecções por representantes do Complexo *Mycobacterium avium* após a introdução do tratamento com antirretrovirais, apresentando um

aumento na imunidade contra alguns tipos de bactérias (GADELHA et al., 2002). A proteção pode ser explicada devido ao fato de pacientes em terapia antirretroviral terem aumento da contagem de células CD4, causando assim, um declínio na incidência de certas infecções bacterianas (KIRK et al., 2000).

Com relação à detecção molecular de *Yersinia*, a banda relacionada ao gênero foi amplificada em 14 amostras dentro de cada grupo, representando uma taxa de detecção de 18% (Tabela 4-6). O resultado demonstra a maior especificidade e sensibilidade da técnica por PCR confrontando ao processo de isolamento clássico (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). Não foi possível fazer uma associação entre o HIV e a probabilidade de ser portador de *Yersinia*, uma vez que os testes do χ^2 e O.R ($\chi^2 = 0$; IC-95% (0,40 – 2,48); P>0,05 (não foi estatisticamente significativo), e o valor de OR=1) demonstraram isso quando o número de bandas amplificadas de *tufA* foi igual nos dois grupos.

Trabalhos com *Real Time* PCR, ainda corroboram com a afirmativa da maior precisão, das técnicas moleculares, na detecção de *Yersinia*, de amostras de fezes, frente ao isolamento em meios de cultura. Em 2007, Zheng e colaboradores fizeram um teste de consistência para comparação da detecção por *Real Time* PCR com quatro métodos por cultura. Das 200 amostras de fezes diarreicas analisadas, 18 (9%) foram positivas no *Real time* PCR e apenas uma deu positiva nos métodos por cultura, demonstrando a maior consistência da técnica molecular frente aos meios de cultura (ZHENG et al., 2007).

De 2005 a 2008, Zheng e colaboradores utilizaram o *Real time* PCR para uma análise randômica da presença de *Y. enterocolitica* nas fezes de pacientes de três hospitais na China, como o mencionado anteriormente para o isolamento por meio de cultura. Foram analisadas 2600 amostras de fezes por *Real time* PCR, detectando a presença de *Y. enterocolitica*, através do gene *ystA*, em 178 (6,8%) amostras. Resultado ligeiramente superior ao por meio de cultura (ZHENG et al., 2008).

Estudos de detecção de *Yersinia*, por PCR, em fezes de ovelhas de abatedouros da Finlândia, revelou uma prevalência de 11% (45/406) (JOUTSEN et al., 2016). Ainda na Austrália, outro estudo utilizou a PCR quantitativa (qPCR) para o gene *rpoB*. Ao analisar a presença de *Yersinia* spp. em fezes de ovelhas de quatro regiões, os autores encontraram uma prevalência de 32% em todas as amostras analisadas, sendo 5,8% de representantes de *Y. enterocolitica* patogênica, cuja a análise foi baseada na presença gene *yst* (YANG et al., 2016).

Todos os estudos na literatura, para uma análise molecular com o intuito de se detectar *Yersinia* de fezes, demonstram que os resultados encontrados nesta investigação estão em

consonância com uma média global de detecção. Fato que corrobora com a hipótese de que as técnicas moleculares podem trazer uma melhoria significativa tanto no aspecto da detecção, quanto na identificação de cepas de *Yersinia*, frente à metodologia do isolamento clássica.

Acredita-se que a metodologia desenvolvida possa ser de grande valia para os estudos de epidemiologia hospitalar e na área veterinária, obviamente complementando-se com outras metodologias, utilizadas em microbiologia, visando uma melhor identificação de *Yersinia*.

Das diversas técnicas de genotipagem empregadas em *Y. enterocolitica*, o MLST vem sendo muito utilizado em estudos epidemiológicos, de estrutura populacional e genética evolutiva entre esta espécie e as outras espécies dentro do gênero *Yersinia* (VIRDI; SACHDEVA, 2005; HALL et al., 2015).

No presente estudo foram encontrados seis *sequence types* dentro da amostragem proposta (Figura 4-4), destes o ST 18 foi predominante, sendo o ST de todas as amostras de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3/4 (Tabela 4-7), independente da fonte de isolamento, data ou região da coleta. Esta é a primeira vez que o ST 18 é reportado no Brasil. Segundo a base de dados do PubMLST o ST 18 é o mais encontrado de *Y. enterocolitica* O:3/4 pelo mundo, já foi isolado de fezes de cães, sangue humano, fezes humanas e de suínos; e de diversas partes do mundo como: Alemanha, Reino Unido e Nova Zelândia (VON ALTROCK et al., 2015).

Este resultado admite a hipótese de que o sorotipo O:3 biotipo 4 é o principal agente de yersiniose em humanos tanto em regiões como na Europa, Japão, Canadá e USA como no Brasil (BOTTONE, 1999; DRUMMOND et al., 2012; PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014). O ST 18 ainda faz parte, como o possível ancestral, de um complexo clonal constituído pelos STs 22, 23, 24, 25, 113 e 144 (Figura 4-4), sendo os cinco primeiros do sorotipo O:3 da Alemanha e o ST 144, do o sorotipo O:3 da Inglaterra. Amostras de *Y. enterocolitica* O:3/4 demonstram ser muito similares, em termos genéticos, quando são encontradas dentro de uma mesma região (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2003; 2006b). Inclusive esta tendência foi observada também no Brasil (PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014). A difusão do ST 18 por amostras de origens suína e humana reforça a hipótese de o suíno ser um importante elemento na cadeia de manutenção e transmissão de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3/4 para o homem no Brasil (PAIXÃO et al., 2013a; RUSAK et al., 2014).

O ST 3 (Figura 4-4) (Tabela 4-7) foi isolado de suínos no Reino Unido, todos do sorotipo O:5 do ano de 2002 e 2005. Os representantes do sorotipo, no presente estudo, são de origem humana, o que pode sugerir que o suíno possa atuar na transmissão ao homem, uma vez que ele já foi encontrado em suínos, bovinos e em cães. Esses animais podem ser possíveis fontes de infecções na transmissão de *Y. enterocolitica* sorotipo O:5 para o homem, devido ao convívio na mesma biocenose (FUKUSHIMA et al., 1993). Este ST ainda se

encontra num grupo altamente relacionado com os STs 6 e 8, todos sorotipo O:5 sendo o primeiro da Nova Zelândia e o segundo do Reino Unido.

Já as amostras do biotipo 2, sorotipo 5b, apresentaram o ST 14 (Tabela 4-7), isolado de carne bovina na Nova Zelândia, de fezes humanas, ovelhas e suínos no Reino Unido. O biotipo 2 é o segundo biotipo mais isolado de humanos, animais e ambiente, no Brasil e no mundo, ficando atrás somente do biossorotipo 4/:O:3. Ainda os representantes deste ST apresentaram todos os genes de virulência cromossomiais, fato que chama a atenção para o potencial patogênico das cepas (FRAZÃO; FALCÃO, 2015). O ST 14 encontra-se num grupo altamente relacionado com o ST 12, que possui representantes dos sorotipos O:3 e O:9, e ao ST 21, o qual alberga representantes do sorotipo O:3 isolados de suínos (Figura 4-4).

O ST 4, do sorotipo O:6 (Tabela 4-7), é constituído por amostras de suíno, do Reino Unido, do ano de 2002, apresentando além os sorotipos O:3 e O:6,30. O sorotipo O:6 ainda figura como um dos sorotipos mais isolados no do biotipo 1A, oriundo de fezes de indivíduos acometidos de doenças gastrointestinais (TENNANT et al., 2003). Este ST ainda se encontra num complexo clonal, no qual possui o ST 17 como o possível ancestral comum (Figura 4-4). O ST 17 também é um representante do sorotipo O:6,30, isolado em 2003 no Reino Unido. Já os outros STs dentro deste complexo são os STs 9,16 e 123, que são respectivamente: uma amostra *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, isolada de fezes humanas na Alemanha; duas do sorotipo O:6,30, isoladas de fezes humanas e de bovino, nos anos de 2002 e 2003 no Reino Unido; e uma, sorotipo O:6,31, isolada na Escócia em 2004.

Já o ST 170, do sorotipo O:4 (Tabela 4-7), o qual foi descrito neste estudo, encontra-se num grupo geneticamente relacionado com os STs 2, 20 e 146, o qual possui o ST 137 como possível ancestral comum dos representantes deste grupo. O ST 137 trata-se de uma amostra isolada na Escócia do sorotipo O:19,8, já quanto aos outros STs do grupo são: no ST 2, o sorotipo O:19,8, o ST 20 foi isolado de ave na Nova Zelândia e não possui sorotipo definido, e o ST 146 o qual também não possui sorotipo definido e nem fonte de isolamento, só se sabe que foi isolado na Inglaterra (Figura 4-4).

Por último, a amostra YE 57, do biossorotipo 1A/O:7, encontra-se em processo de entrada no banco de dados do PubMLST (Tabela 4-7). Sabe-se que se encontra num ramo entre os anteriormente citados ST 137 e ST 2 (Figura 4-4).

Os resultados do MLST corroboram com os da literatura, demonstrando como o biotipo 1A constitui um grupo bem diverso geneticamente (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2004; SACHDEVA; VIRDI, 2004; KRAUSHAAR et al., 2011; VON ALTROCK et al., 2015).

O sequenciamento de nova geração (NGS) revelou que os tamanhos dos genomas das amostras analisadas, bem como o conteúdo CG, para *Y. enterocolitica* estão plenamente de acordo com os ditos da literatura (Tabela 4-8) (BATZILLA et al., 2011b; WANG et al., 2011; GARZETTI et al., 2013; SAVIN et al., 2013; JOHNSON et al., 2015).

Quanto à pesquisa por genes de resistência aos antimicrobianos, com base no ARG-ANNOT e no ResFinder, foram revelados em todas as amostras os seguintes genes: o gene *blaA* 2 (Tabela 4-9), responsável pela produção da β -lactamases A (enzima do grupo 2b, de largo espectro constitutivo da classe A), que confere certa resistência aos antibióticos β -lactâmicos. A presença e a distribuição dos genes *blaA* e *blaB* varia com o biotipo e distribuição geográfica das amostras analisadas (BONKE et al., 2011). Amostras do biotipo 4 da Europa, Ásia e Brasil normalmente expressam os dois genes, e as da Austrália e Nova Zelândia costumam expressar somente o *blaA* (PHAM et al., 1995).

Em relação ao gene *vat* ou *sat*, responsável pela produção de uma enzima chamada de *Streptogramin A acetyltransferase* que inativa à estreptogramina, que atua inibindo a síntese proteica nos ribossomos, além de ser um fator de resistência intrínseco de bactérias Gram-negativas. A sequência da proteína Sat de *Y. enterocolitica* mostrou ser muito próxima da sequência do produto do gene *sat* de bactérias Gram-negativas e cianobactérias, sugerindo assim uma origem evolutiva comum (SEOANE; GARCÍA LOBO, 2000; SABINA et al., 2011).

Na cepa YE 54 foi encontrado um plasmídio que apresentou 98% de similaridade, quanto à sequência de nucleotídeos, com o plasmídio pSTU288-2 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium U288. Esta cepa emergiu como um importante patógeno de suínos no Reino Unido, que carregavam três plasmídios transmissíveis, contendo dentre eles o supracitado (HOOTON et al., 2014). Considerando a fonte da cepa, é possível deduzir, com base em todas as observações retrospectivas, que o suíno talvez tenha sido o indivíduo no qual as duas espécies se encontraram, favorecendo a conjugação do plasmídio. Apesar da cepa YE 54 ser de origem humana, contudo, admite-se que sua origem atecedente tenha sido o suíno.

As informações disponíveis sobre a auto-transmissão de plasmídios em *Yersinia* é escassa. No entanto, já foi relatada a conjugação do plasmídio *lac* entre *Y. enterocolitica* e *E. coli*, que é livremente transmitido entre elas (CORNELIS et al., 1976; HAMMERL et al., 2008). Também foram relatadas a auto-transmissão do plasmídio R, em *Yersinia*, que confere resistência a vários antibióticos (KANAZAWA; KURAMATA, 1975; GALIMAND et al., 1997; HAMMERL et al., 2008). Estes achados corroboram com a hipótese aventada, de que este plasmídio tenha sido conjugado entre a *Salmonella* e a *Y. enterocolitica*.

O plasmídeo pSTU288-2 possui 11 kb de tamanho e codifica um complemento de genes que, conferem resistência ao cloranfenicol, neomicina (substituída por gentamicina), estreptomicina e tetraciclina (HOOTON et al., 2014). Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos revelou a resistência para estreptomicina e tetraciclina. *Y. enterocolitica* normalmente é susceptível à aminoglicosídeos como gentamicina e estreptomicina, no entanto, amostras resistentes a estreptomicina, como a revelada por esta investigação, já tenham sido registradas ao redor do mundo (BAUMGARTNER et al., 2007; BONKE et al., 2011). Os genes responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeo neste plasmídeo são *strA* e *strB*. O primeiro é responsável pela transcrição da enzima Aph da família de enzimas fosfotransferases, que confere resistência à estreptomicina. O segundo transcreve uma proteína da família das quinases de resistência a aminoglicosídeo/hidroxiuréia, que confere resistência aos mesmos (HOOTON et al., 2014).

O histórico de resistência à tetraciclina varia na literatura. *Y. enterocolitica* patogênica, isolada de suíno, com alta resistência à tetraciclina, foi relatada nos EUA, Grécia, República Tcheca e no Brasil (BONKE et al., 2011; RUSAK et al., 2014). O gene responsável pela resistência à tetraciclina neste plasmídeo é o *tetA* (HOOTON et al., 2014). Essa resistência é um fato preocupante, pois a tetraciclina é utilizada comumente no tratamento de infecções em animais, além de ser um dos antibióticos recomendados pela Organização Mundial de Saúde para a terapêutica inicial das infecções por *Y. enterocolitica* (BONKE et al., 2011; FÀBREGA; VILA, 2012).

A resistência encontrada nesta amostra está circunstanciada com o achado do plasmídeo, sugerindo a responsabilidade da resistência, além de ser expresso, de forma parcial, uma vez que a resistência ao cloranfenicol e gentamicina não foram encontradas.

Na análise quanto aos genes de virulência, e com base no VFDB, foram detectados um total de 103 genes (Tabela 4-9; Figura 4-5). Os genes estão relacionados à motilidade, aos sistemas de secreção, as toxinas, ao antígeno O (lipopolissacarídeo – LPS), a captação de ferro, a invasão e a aderência, revelando um amplo potencial do espectro de virulência das amostras.

Foram detectados os determinantes de virulência de motilidade controlados pelos genes *flhE*, *fliN*, *fliL*, *flgA*, *fliD*, *fliC*, *fliP*, *flgD*, *flhA*, *fliS*, *flhB*, *flgK*, *fliF*, *flgB*, *flgJ*, *flgC*, *flgL*, *flgN*, *flgM*, *flhC*, *fliE*, *fliO*, *fliH*, *flgE*, *fliB*, *fliA*, *fliK*, *fliI*, *flgF*, *flgI*, *fliG*, *fliR*, *flgH*, *flhD*, *flgG*, *fliT*, *fliM*, *fliZ* e *fliQ* (Tabela 4-9). Esses genes, de uma forma geral, são responsáveis pela transcrição de proteínas que vão atuar durante o processo de invasão celular, formação do biofilme e no sistema de secreção (Sistema de secreção flagelar do tipo III/aparato de biossíntese do flagelo) (YOUNG et al., 1999; KAPATRAL et al., 2004; KIM; YOUNG;

YOUNG, 2008). Antes de *Y. enterocolitica* estabelecer um contato íntimo com o epitélio intestinal, tem sido demonstrado que o flagelo, que permite a motilidade, tem um papel importante no início da invasão da célula hospedeira (FÀBREGA; VILA, 2012). De todos os genes supracitados, os que merecem maior destaque são *flhD* e *flhC*, pois como o exposto anteriormente, constituem o topo da hierarquia e coordenam a expressão de todos os outros genes flagelares (YOUNG et al., 1999). Ainda, os genes *flgE*, *fliI*, *flhD* e *fliA* atuam diretamente na produção de biofilme, que age provendo uma superfície para a bactéria se aderir, formando uma barreira física que permite que as células bacterianas permaneçam juntas, aumentando a resistência aos estresses físicos, químicos e biológicos (KIM et al., 2008; HAM; KIM, 2016).

Continuando na motilidade, foram encontrados os genes *cheA*, *cheB*, *cheD*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ* (Tabela 4-9). Esses genes agem no mecanismo de quimiotaxia, pelo qual as bactérias respondem de forma eficiente e rápida as mudanças químicas que ocorrem no ambiente em que habitam. Tal comportamento modula a direção da rotação flagelar, ajudando na adaptação da bactéria ao meio. Finalizando a motilidade, foram detectados também os genes *motA* e *motB*, os quais são responsáveis por transcrever, respectivamente, as proteínas MotA e MotB que formam o motor flagelar, construindo a supramolecular do complexo estator flagelo-motor (BREN; EISENBACH, 2000).

Na parte dos sistemas de secreção, foram identificados os genes *ystII*, *ystIJ*, *ystIK*, *ystIF*, *ystIE*, *ystIG*, *ystIC* e *YE105_C0912* (Tabela 4-9). Tais genes são responsáveis por transcrever proteínas que formam o sistema de secreção do tipo II (T2SS). Todas as espécies de *Yersinia*, patogênicas ou não, apresentam ao menos um dos dois tipos de T2SS existentes. O T2SS, que tem sido estudado mais extensivamente, está presente na cepa *Y. enterocolitica* do biotipo 1B (patogênica humana). Experimentos de infecção em modelo murino demonstraram que o tipo de T2SS, conhecido como Yst1, está envolvido nos processos de disseminação e colonização do patógeno em tecidos como o fígado e o baço. Outrossim, o Yst1 também atua na sobrevivência da bactéria no ambiente extra-hospedeiro. Quanto ao papel do segundo T2SS, chamado de Yst2, ainda é pouco conhecido, e nenhuma proteína secretada foi identificada. Além disso, o gene *YtsIO* é responsável pela transcrição da proteína YtsIO, uma suposta prepilina peptidase, que tem como função clivar, dentre outras substâncias, as sequências principais de proteínas tipo prepilina, utilizadas pelo T2SS em bactérias Gram-negativas (LILES et al., 1999; VON TILS et al., 2012).

Continuando nos sistemas de secreção foram encontrados os genes *YE105_C0309*, *YE105_C0310*, *YE105_C0312*, *YE105_C0313*, *YE105_C0314*, *YE105_C0323*, *YE105_C0324*, *YE105_C0325*, *YE105_C0326*, *YE105_C0327*, *YE105_C0328*, *YE105_C0332*, *YE105_C0333*,

YE105_C0334, *YE105_C0335*, *YE105_C0336*, *YE105_C0338*, *YE105_C0339*, *YE105_C0340* e *YE105_C0341* (Tabela 4-9). Estes genes receberam a sigla do nome da cepa de origem, sendo que o grupo de genes é responsável pela transcrição de proteínas que formarão o Ysc T3SS (plasmidial). Como foi exposto anteriormente, *Y. enterocolitica* possui três tipos de T3SS diferentes: o Ysc (codificado por pYV), Ysa (exclusivo do biotipo 1B) e o flagelar. No entanto, de forma surpreendente, os genes encontrados nos genomas analisados, foram anotados como sendo os responsáveis pela transcrição das proteínas YscC, R e U, que são proteínas pertencentes ao Ysc T3SS. Este resultado reforça a hipótese de que tais amostras, ou suas antecessoras, tenham sido portadoras de pYV e, provavelmente, de alguma forma os genes teriam sido integrados aos seus genomas. Lesic e colaboradores (2012) fizeram experimentos com *Y. pseudotuberculosis*, no qual mimetizavam o ambiente natural do patógeno, onde demonstraram as condições perfeitas para a ocorrência de transferência horizontal de genes. No estudo, observaram que poderiam virtualmente transferir qualquer parte de DNA de um cromossomo ou plasmídeo para uma nova bactéria (LESIC et al., 2012). Talvez isso possa explicar o fenômeno que observamos.

Na parte das toxinas, foi detectado o gene *ystA* (*Yersinia stable toxin*) (Tabela 4-9), responsável pela produção de uma enterotoxina que causa diarreia, encontrado predominantemente nos sorotipos patogênicos (RAMAMURTHY et al., 1997). Este gene não foi encontrado pela PCR na cepa YE 19 (Tabela 4-1), no entanto, foi detectado na mesma cepa através do NGS (Tabela 4-9), evidenciando a acurácia e a confiabilidade da técnica.

A presença dos genes *YE105_C0173*, *YE105_C1175*, *YE105_C1176*, *YE105_C1177*, *YE105_C1178*, *YE105_C1179*, *YE105_C1180*, *YE105_C1181* e *YE105_C1182*, está relacionada ao antígeno O (Tabela 4-9). O antígeno O ou cadeia polissacarídica O (LPS) está associado à propriedade antigênica e aos processos de invasão e colonização. Como exposto anteriormente, tem papel importante na relação bactéria-hospedeiro, assim como é necessário para a funcionalidade e expressão dos fatores de virulência externos à membrana (BENGOECHEA et al., 2004; FÀBREGA; VILA, 2012).

No que tange à captura do ferro, foram encontrados os genes *hemP*, *hemR*, *hemS*, *hemT*, *hemU* e *hmuV* (Tabela 4-9) que permitem a cepa utilizar os compostos de heme como fonte para aquisição de ferro. Esta é uma característica importante para bactérias invasoras, uma vez que os compostos de heme são abundantes nos hospedeiros e a sua utilização como fonte de ferro é de grande valia durante a infecção (STOJILJKOVIC; HANTKE, 1992). Salienta-se que estes genes não são os mesmos encontrados no yersiniabactin (FÀBREGA; VILA, 2012).

Os genes de virulência comumente analisados *inv* (invasive gene) e *ail* (attachment invasion locus) foram encontrados em todas as amostras do sorotipo O:3 estudadas pelo sequenciamento, com a única exceção do gene *ail* na amostra YE 51 (sorotipo O:5) (Tabela 4-9). Estes genes codificam uma invasina, que inicia diretamente à invasão celular; e a proteína externa de membrana Ail, também atua na invasão de células epiteliais, respectivamente (SABINA et al., 2011). Ao se confrontar os resultados da PCR com os do sequenciamento, observa-se que no da PCR a cepa YE 19 não apresentou a amplificação de nenhuma banda dos genes de virulência e a YE 51 só apresentou a banda do gene *inv* (Tabela 4-1), compatibilizando-se com os resultados do gene *ystA*. Por sinal o resultado demonstra o apuro da técnica do sequenciamento na detecção dos genes de virulência.

O gene *psaA* (*myfA*) (Tabela 4-9) está relacionado à adesão e faz parte do fator mucoide da *Yersinia* (*Myf*) em *Y. enterocolitica*, homólogo ao antígeno pH 6 de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* (YANG; ISBERG, 1997; MIKULA et al., 2012). O locus *myf* codifica vários genes como *myfA*, *myfB*, *myfC*, *myfE* and *myfF* os quais, constituem a estrutura fimbriar que atua na adesão (FÀBREGA; VILA, 2012). O fator pertence à classe das adesinas que são secretadas/montadas na via, denominada caminho das chaperonas. *myfA/psaA* codifica a principal subunidade fimbriar, já *myfB/psaB* e *myfC/psaC* são requeridos para o transporte da subunidade através da membrana plasmática e na montagem da subunidade na fímbria. *myfB/psaB* é um membro da família das chaperonas periplasmáticas PapB e pode atuar como chaperona para MyfA/PsaA, enquanto que MyfC/PsaC atua como montador na parte externa da membrana bacteriana. E, MyfE/PsaE e MyfF/PsaF são requeridos para a transcrição de *myfA/psaA* (IRIARTE; CORNELIS, 1995; MAKOVEICHUK et al., 2003; FÀBREGA; VILA, 2012).

O gene *YplA* (Tabela 4-9) é responsável pela transcrição de fosfolipase A, secretada pelo sistema de secreção flagelar do tipo III, durante o processo de invasão, auxiliando à sobrevivência da *Y. enterocolitica* nas placas de Peyer, assim como, estimula uma resposta inflamatória aguda no hospedeiro (YOUNG et al., 2000; GALINDO et al., 2011).

O gene *pla* (Tabela 4-9), que foi detectado na cepa W22703 de *Y. enterocolitica* (FUCHS et al., 2011), também foi reconhecido no genoma de todas as amostras analisadas. O gene codifica uma proteína conhecida como Peptidase A26 omptin, com função proteolítica e de adesão (MIKULA et al., 2012). Uma procura *Blast* no banco de dados do Genbank pelas sequências do gene *pla* demonstrou uma identidade nucleotídica da ordem de 30% com a sequência do mesmo gene de *Y. pestis* (cepa I-3190 plasmídeo pPst). No entanto, estudos com maior profundidade são necessários para descobrir a real correlação entre os dois genes.

A falta dos genes *ail*, *psaA* e *ystA* na cepa YE 51 (Tabela 4-9) está de acordo com as citações na literatura, demonstrando que os representantes do biotipo 1A são tidos como menos virulentos que os representantes de outros biotipos, salvo algumas exceções (ROBINS-BROWNE, 2007).

Os resultados do sequenciamento se identificam com os achados de Batzilla e colaboradores (2011) que sugerem que as amostras de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 analisadas carregam um conjunto de determinantes de virulência que podem atuar como uma espécie de adaptações com consequências patológicas para o hospedeiro. Talvez, o fato justificaria o sucesso na disseminação do biossorotipo 4/O:3 no Brasil e no mundo. Projetando-se o problema no Brasil, em consideração as cepas portadoras de todos os genes de virulência, admite-se que poderão representar um potencial risco para crianças de tenra idade e pessoas imunocomprometidas, tornando a yersiniose uma importante causa de morbidade e mortalidade (GALINDO et al., 2011).

Julga-se que a análise de dados genômicos, ora estabelecidos, possibilitará o entendimento da capacidade de virulência de cepas isoladas no Brasil, enriquecendo como subsídios para estudos com *Y. enterocolitica*.

No que tange a detecção proteica, a cepa YE 54 demonstrou um abundante número de proteínas ligadas à aquisição de metais, tais como a proteína HemY, ferroquelatase, proteínas HemS de transporte da hemina, etc (Tabela 4-10). O papel da aquisição de ferro durante o processo de patogênese da yersiniose começou a ser elucidado na década de 1980 do século passada, através da demonstração da produção do sideróforo pelos sorotipos mais virulentos de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Como o exposto anteriormente, compostos de heme são abundantes nos hospedeiros, constituindo uma importante fonte de ferro para o microrganismo invasor. As mais de 2g de heme-ferro contidos na hemoglobina representam um perigoso reservatório de ferro para o hospedeiro. Quando o ferro se torna disponível através da hemólise, faz com que o hospedeiro se torne dramaticamente mais susceptível a infecções e suas complicações (STOJILJKOVIC; HANTKE, 1992).

Além do ferro, várias outras proteínas para aquisição de outros metais também foram encontradas, como a proteína reguladora da absorção de zinco e a Carboximetiltransferase U34 tRNA, atuando, respectivamente, na aquisição de zinco e cobre (Tabela 4-10). Para todos os microrganismos, a aquisição de íons de metal é de suma importância para sua sobrevivência no ambiente, bem como dentro de um hospedeiro. No entanto, é crítico para a bactéria assegurar que a aquisição e disponibilidade dos metais está de acordo com as suas necessidades fisiológicas, e que o desequilíbrio na homeostasia de alguns destes metais pode ser um fator deletério para a bactéria. Ainda, como estratégias do hospedeiro contra à

infecção, consistem na inanição da bactéria pelo sequestro dos metais, ou na toxicidade causada pela alta concentração dos mesmos, em consequência de sua liberação exacerbada. Como uma forma de suplantar às estratégias do hospedeiro, as bactérias desenvolveram uma variedade de sistemas de aquisição e exportação de metais, com o intuito de regular à sua homeostasia interna, através de vários reguladores transcricionais, permitindo que elas se adaptem as mudanças nesse ambiente. Como consequência, os sistemas de aquisição de ferro, cobre, magnésio e zinco contribuem significativamente para a virulência de muitas bactérias patogênicas (PORCHERON et al., 2013).

Várias proteínas em resposta aos estresses: osmótico, oxidativo, temperatura, dentre outros, foram expressas (Tabela 4-10). As bactérias em geral desenvolveram diversos mecanismos para conviver com o estresse e a adaptação as mudanças do ambiente (PHADTARE; SEVERINOV, 2010). Muitas produzem as conhecidas proteínas do shock térmico (*cold shock proteins*- Csps), que agem em resposta às rápidas variações de temperatura (KETO-TIMONEN et al., 2016). No entanto, algumas proteínas não são induzíveis apenas através da temperatura, pois alguns estudos demonstraram que elas estão envolvidas em vários processos biológicos que promovem o crescimento normal e a respostas de adaptação ao estresse. As Csps demonstraram contribuir com a tolerância aos estresses: osmótico, oxidativo, inanição, pH e etanol, bem como durante o processo de invasão à célula hospedeira (KETO-TIMONEN et al., 2016). Proteínas como a piruvato quinase, fatores de regulação transcricional (fator anti-sigma-28), fatores de ativação, Chaperonas, dentre outros (Tabela 4-10), são apenas alguns exemplos de Csps (PHADTARE; SEVERINOV, 2010).

No que tange as proteínas ligadas ao estresse oxidativo, citam-se aquelas expressas na investigação: a Glutarredoxina, a Superóxido dismutase, a proteína ArnA bifuncional de resistência à polimixina, proteína Flavohemo, Tiorredoxina, Catalase, dentre outras (Tabela 4-10). Espécies reativas de oxigênio (ROS) como aniões de superóxido (O_2^-), radicais de hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (P_2O_2) são conhecidos por danificar os ácidos nucléicos, lipídeos e as proteínas. Os ROS são produzidos por células do sistema imune, como os macrófagos, no combate a infecções bacterianas, logo as bactérias que conseguem neutralizar os radicais de oxigênio obtêm um maior sucesso durante a infecção. A enzima que realiza bem o papel de neutralização está representada pela Superóxido dismutase. Sendo ubiqüitária desde procariotos até eucariotos, trata-se de uma metaloenzima com a capacidade de desmutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que ainda é reduzido seguidamente à água e oxigênio pela Catalase. Em síntese, desempenha um papel importante na sobrevivência da bactéria patogênica dentro do fagócito (IMLAY; LINN, 1988; DHAR; GUPTA; VIRDI, 2013).

A proteína F reguladora do Quorum-sensing e a proteína TabA toxina-antitoxina do biofilme (Tabela 4-10) sugerem uma possível interação com outras bactérias do meio (AVICAN et al., 2015).

As proteínas de ligação da penicilina (PBPs) 1b, 2, 4, 5, 6 e 7 (Tabela 4-10), constituem um grupo de proteínas caracterizado pela afinidade de ligação à penicilina. Tratam-se de enzimas ligadas à membrana que estão envolvidas no estágio final da síntese da parede celular no lado periplasmático da membrana (peptidoglicano). O peptidoglicano bacteriano não só ajuda à bactéria a resistir à pressão de várias atmosferas que existe no ambiente intracelular, como serve para manter sua estrutura celular que será passada para os seus descendentes (SAINSBURY et al., 2011). As bactérias possuem um número variável de PBPs, sendo divididos em duas principais categorias: as de alta massa molecular (HMM), essenciais para a viabilidade celular e as de baixa massa molecular (LMM) que parecem ser dispensáveis para o crescimento celular (SAUVAGE et al., 2008; SAINSBURY et al., 2011). Os PBPs se ligam aos antibióticos betalactâmicos porque são similares quimicamente às peças modulares que formam o peptidoglicano, tornando-se uma ligação irreversível e naturalmente inativando a enzima. A resistência aos antibióticos ocorre pela superprodução de PBPs e/ou a formação de PBPs que apresentam baixa afinidade para as penicilinas (CHAMBERS, 1999). Os PBPs mais envolvidos na resistência às penicilinas são os 2, 4 e 5 (SMITH et al., 2013; LEE et al., 2015a; JOUSSELIN et al., 2016).

No contexto da resistência, foi encontrada a subunidade TolC da bomba de efluxo (Tabela 4-10), subunidade que em conjunto com a subunidade AcrAB formam a bomba de efluxo AcrAB-TolC. Esta bomba é capaz de transportar uma gama de compostos com baixa similaridade química, e assim conferindo a resistência a um amplo espectro de antibióticos (DU et al., 2014).

Quanto às proteínas externas de membrana (Omp - *Outer membrane protein*) foram encontradas: A, C, k36, C2, F, W e X (Tabela 4-10). As Omps A, C e F são identificadas como proteínas imunogênicas em cepas virulentas de *Y. enterocolitica* dos biossrotipos 1B/O:8 e 2/O:9 na China (GU et al., 2012). A OmpA é altamente conservada dentro das enterobactérias, além de ter a habilidade de ativar os macrófagos, contribuindo com a capacidade das bactérias Gram-negativas de invadir as células de mamíferos (SOULAS et al., 2000). A OmpF (porina F) é a maior proteína da parte externa da membrana de bactérias Gram-negativas, sendo responsável por auxiliar a difusão de compostos de baixo peso molecular, fazendo parte da primeira linha de defesa bacteriana, além de interagir com ambientes bióticos e abióticos (STENKOVA et al., 2011). A OmpC (Ompk36) varia de expressão de acordo com as condições externas. Quando a temperatura e/ou a osmolaridade

aumentam, (como dentro de um hospedeiro mamífero), aumenta a expressão OmpC. No entanto, de forma inversa, quando diminui a temperatura e/ou a concentração de nutrientes (fora do organismo), o gene *ompC* é suprimido e a OmpF se torna a porina mais expressa (em termos quantitativos) na membrana externa bacteriana (VOSTRIKOVA et al., 2013).

Os resultados obtidos concordam com os achados de Gu e colaboradores (2012) que as Omp A, C e F podem ser utilizadas como marcadores moleculares ou alvos para vacinas de cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas, inclusive no Brasil.

A OmpX é uma proteína homóloga a Ail, sendo responsável pela aderência às células de mamíferos e a proteção contra o sistema imune (VAIPHEI et al., 2011). Da mesma maneira, a OmpW confere resistência à imunidade inata do hospedeiro (LI et al., 2016).

As proteínas UreD, UreF, UreG e outras (Tabela 4-10), fazem parte do sistema da urease, comandado pelo complexo de genes *ureABCEFGD*. O estômago serve como uma barreira para infecções entéricas devido ao baixo pH originado pelo ácido hidrocloreídrico presente no suco gástrico. O mecanismo de tolerância da *Y. enterocolitica* ao ambiente ácido é através da atividade da urease, que hidrolisa a uréia formando dióxido de carbono e amônia, elevando o pH do meio gástrico. Sem dúvida que a urease contribui para sobrevivência e a virulência de *Y. enterocolitica*, durante a sua passagem pelo estômago (DE KONING-WARD; ROBINS-BROWNE, 1995).

Salienta-se que os genes *hemS*, *inv* e *blaA* demonstraram suas atividades, considerando que suas proteínas foram detectadas pela técnica da proteômica.

No que tange à expressão em diferentes temperaturas, a Tabela 4-11 demonstra as proteínas que variaram bastante nas duas condições. A proteína bifuncional ArnA envolvida na síntese de lipopolissacarídeos (LPS), mais precisamente do lipídio A, modificando a arabinose que está acoplada a ele. Tal modificação é requerida para proporcionar resistência à ação da polimixina (YAN et al., 2007). As modificações no LPS contribuem para a sobrevivência de *Salmonella* no ambiente extra-hospedeiro, e por analogia com o resultado obtido, entende-se porque a proteína teve uma maior expressão à temperatura abaixo de 37°C (WINFIELD; GROISMAN, 2004).

A Protease Do (Tabela 4-11) é uma enzima multimérica com um papel importante na degradação das proteínas intracelulares, além de ser essencial para a sobrevivência da bactéria em altas temperaturas, que se compatiliza com a sua maior expressão a 37°C (SEOL et al., 1991).

As chaperonas, como visto anteriormente, tratam-se de um tipo especial de proteínas do choque térmico auxiliando na formação da estrutura quaternária de outras proteínas. Outra função importante das chaperonas reside em prevenir à associação não específica letal entre as

proteínas sob condição de estresse, logo justificando a maior expressão da chaperonina GroEL e da chaperona HtpG a 37°C (Tabela 4-11) (RYABOVA et al., 2013).

Os resultados da proteômica se coadunam com o da genômica, demonstrando que a *Y. enterocolitica* biossrotipo 4/O:3 revela um imenso arsenal adaptativo, tanto para sobrevivência no hospedeiro como no meio externo, possivelmente justificando a sua capacidade de disseminação.

6 CONCLUSÕES

- *Y. enterocolitica* biossoro tipo 4/O:3, de fontes humana e suína, apresentaram todos os genes de virulência analisados, reafirmando a hipótese de caráter cosmopolita de que o suíno desempenha em nosso meio a figura de reservatório de cepas patogênicas.
- A presença de genes de virulência nas amostras do biotipo 1A pode ser indicativo de que esse agente poderá ser capaz de desencadear infecções.
- A Duplex-PCR foi elaborada no sentido de ser um método rápido, barato e fácil de execução, aplicado no caso de triagem de amostras, capaz de detectar *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, outros sorotipos, bem como outras espécies de *Yersinia*, diretamente do DNA total extraído de um espécime.
- A análise experimental através da Duplex-PCR do crescimento bacteriano proveniente das fezes dos dois grupos de grávidas revelou a não associação entre o HIV e a probabilidade de ser portador de *Yersinia*.
- A ausência de isolamento de *Yersinia* das fezes do grupo das grávidas HIV+ e a taxa de prevalência igual nos dois grupos levantam a hipótese de que esses resultados possam ser em decorrência da melhora imunológica, frente às infecções secundárias, observada em pacientes sob tratamento com o coquetel anti-HIV.
- O isolamento de representantes do sorotipo O:3 biotipo 4 do ST 18 de amostras humanas e de suínos, reforça a tese de ser o suíno um elo importante na cadeia de transmissão de *Y. enterocolitica* ao homem.
- Os resultados do MLST corroboram com os da literatura, demonstrando como o biotipo 1A constitui um grupo diverso geneticamente.
- O NGS revelou a presença do plasmídeo pSTU288-2 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium U288 na amostra YE 54, e conferindo resistência à estreptomicina e tetraciclina, sugerindo que a *Y. enterocolitica* é suscetível à aquisição desse plasmídeo.
- O NGS evidenciou a existência de genes relacionados à motilidade, sistemas de secreção, toxinas, do antígeno O (lipopolissacarídeo – LPS), captação de ferro, invasão e aderência, cujo painel revela o potencial de virulência das amostras analisadas.
- Os resultados do NGS sugerem que as *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 analisadas, carregam um conjunto de determinantes de virulência atuando como adaptações

com consequências patogênicas ao hospedeiro. Isto justificaria a facilidade da disseminação do biossoro tipo 4/O:3 no Brasil e no mundo.

- A proteômica revelou à expressão de proteínas ligadas à aquisição de metais, resposta a fatores de estresse, a virulência e a resistência como a bomba de efluxo AcrAB–TolC.
- As Omp A, C e F encontradas, por terem características imunogênicas, corroboram com a literatura no sentido de serem candidatas a marcadores moleculares de cepas do nosso país.
- Os resultados da proteômica corroboram com o da genômica, demonstrando que a *Y. enterocolitica* biossoro tipo 4/O:3 está constituída de um imenso arsenal adaptativo, tanto para sobrevivência no hospedeiro como no meio externo.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectiva futura, diante dos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de se utilizar e aprofundar cada vez mais através das ferramentas de sequenciamento e proteômica as investigações sobre a *Y. enterocolitica*, patógeno zoonótico, por hora, pouco estudado. Ademais, deve-se realizar uma contínua análise genotípica recorrendo às outras técnicas moleculares, com envolvimento de um maior número de amostras provenientes de casos humanos e de diversas espécies de animais, com o intuito de ampliar as análises epidemiológicas e ecológicas dos genótipos circulantes em nosso país.

Esperamos que essa análise de dados genômicos e proteômicos possa ajudar no entendimento a respeito de virulência de cepas do Brasil, bem como sejam utilizadas como base de dados para estudos com *Y. enterocolitica* ao redor do mundo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

AILI, M.; ISAKSSON, E. L.; HALLBERG, B.; WOLF-WATZ, H.; ROSQVIST, R. Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1020–1033, 2006.

ALEXANDRINO, M.; GROHMANN, E.; SZEWZYK, U. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. **Water Research**, v. 38, n. 5, p. 1340–1346, 2004.

ALUGUBELLY, N.; HERCIK, K.; KIBLER, P.; NANDURI, B.; EDELMANN, M. J. Analysis of differentially expressed proteins in *Yersinia enterocolitica*-infected HeLa cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1864, n. 5, p. 562–569, 2016.

ANDERSON, S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 13, p. 3015–3027, 1981.

ARNOLD, T.; HENSEL, A.; HAGEN, R.; ALEKSIC, S.; NEUBAUER, H.; SCHOLZ, H. C. A highly specific one-step PCR - assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 285–9, 2001.

ASADISHAD, B.; GHOSHAL, S.; TUFENKJI, N. Role of Cold Climate and Freeze–Thaw on the Survival, Transport, and Virulence of *Yersinia enterocolitica*. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 24, p. 14169–14177, 17 dez. 2013.

ASENSI, M. D.; HOFER, E. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. I – Bacteriologia. **Revista Microbiologia** (São Paulo), v.16, p.260-268, 1985.

ASENSI, M. D.; HOFER, E. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. II – Sorologia. **Revista Microbiologia** (São Paulo), v.17, p.58-63, 1986.

ATKINSON, S.; WILLIAMS, P. *Yersinia* virulence factors - a sophisticated arsenal for combating host defences. **F1000Research**, v. 5, p. 1–10, 2016.

AVICAN, K.; FAHLGREN, A.; HUSS, M.; HEROVEN, A. K. athrin; BECKSTETTE, M.; DERSCH, P.; FÄLLMAN, M. Reprogramming of *Yersinia* from virulent to persistent mode revealed by complex in vivo RNA-seq analysis. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004600, 2015.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. a.; PEVZNER, P. a. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

BARI, M. L.; HOSSAIN, M. A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. **Journal of pathogens**, v. 2011, p. 420732, 2011.

BASTARDO, A.; RAVELO, C.; ROMALDE, J. L. Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1888–1897, 2012.

BATZILLA, J.; ANTONENKA, U.; HÖPER, D.; HEESEMANN, J.; RAKIN, A. *Yersinia enterocolitica* *paleoarctica* serobiotype O:3/4 - a successful group of emerging zoonotic pathogens. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 348, 2011a.

BATZILLA, J.; HÖPER, D.; ANTONENKA, U.; HEESEMANN, J.; RAKIN, A. Complete genome sequence of *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoarctica* Serogroup O:3. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2067–2065, 2011b.

BAUMGARTNER, A.; KÜFFER, M.; SUTER, D.; JEMMI, T.; ROHNER, P. Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 110–114, 2007.

BENGOECHEA, J. A.; NAJDENSKI, H.; SKURNIK, M. Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 451–469, 2004.

BENT, Z. W.; BRANDA, S. S.; YOUNG, G. M. The *Yersinia enterocolitica* Ysa type III secretion system is expressed during infections both in vitro and in vivo.

MicrobiologyOpen, v. 2, n. 6, p. 962–975, 2013.

BHADURI, S.; CONWAY, L. K.; LACHICA, R. V. Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1039–1042, 1987.

BHADURI, S.; TURNER-JONES, C.; TAYLOR, M. M.; LACHICA, R. V. Simple assay of calcium dependency for virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 798–800, 1990.

BHADURI, S.; WESLEY, I. V.; BUSH, E. J. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7117–7121, 2005.

BIEDZKA-SAREK, M.; JARVA, H.; HYYTIÄINEN, H.; MERI, S.; SKURNIK, M. Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4100–4109, 2008.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1549–1554, 2010.

BOLAND, A.; CORNELIS, G. R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. **Infection and immunity**, v. 66, n. 5, p. 1878–84, 1998.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

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

BONKE, R.; WACHECK, S.; STÜBER, 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. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 17, n. 4, p. 575–81, 2011.

BOQVIST, S.; PETTERSSON, H.; SVENSSON, a; ANDERSSON, Y. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in children in Sweden, 2004: a case-control study. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 6, p. 897–905, 2009.

BOTTONE, E. J. *YERSINIA ENTEROCOLITICA*: A PANORAMIC VIEW OF A CHARISMATIC MICROORGANISM. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 211–241, 1977.

BOTTONE, E. J. Current trends of *Yersinia enterocolitica* isolates in the New York City area. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 63–67, 1983.

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

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 4, p. 323–333, 1999.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n.º 711, de 01 de novembro de 1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 1995.

BREN, A.; EISENBACH, M. How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 6865–6873, 2000.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: An iron-uptake island. **Microbes and Infection**, p. 161–167, 2001.

CARNIEL, E.; GUILVOUT, I.; PRENTICE, M. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 23, p. 6743–6751, 1996.

CHAMBERS, H. F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179 Suppl, n. Suppl 2, p. S353-9, 1999.

CHAUHAN, N.; WROBEL, A.; SKURNIK, M.; LEO, J. C. *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 9–10, p. 949–963, 2016.

CHINA, B.; MICHIELS, T.; CORNELIS, G. R. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein, YlpA, related to TraT. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1585–1593, 1990.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **27th ed. clsi supplement m100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COCOLIN, L.; COMI, G. Use of a culture-independent molecular method to study the ecology of *Yersinia* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 71–82, 2005.

CORBEL, M. J.; ELLIS, B.; RICHARDSON, C.; BRADLEY, R. Experimental *Yersinia enterocolitica* placentitis in sheep. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 4, p. 339–349, 1992.

CORNELIS, G.; BENNETT, P. M.; GRINSTED, J. Properties of pGC1, a lac plasmid originating in *Yersinia enterocolitica* 842. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1058–62, set. 1976.

CORNELIS, G. R. The *Yersinia* Ysc–Yop “Type III” weaponry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 742–754, 2002a.

CORNELIS, G. R. *Yersinia* type III secretion: Send in the effectors. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 401–408, 2002b.

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

COSTA, G.A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de Enterobactérias. **Editores Fiocruz** (Rio de Janeiro), p. 120, 1972.

CVE/SES-SP. Manual de Vigilância ativa das doenças transmitidas por alimentos - Normas e Instruções. **DDTHA/CVE**, São Paulo, p.27, 2002.

(Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/manu_va02.pdf)

DALIGAULT, H. E.; DAVENPORT, K. W.; MINOGUE, T. D.; BISHOP-LILLY, K. A.; BROOMALL, S. M.; BRUCE, D. C.; CHAIN, P. S.; COYNE, S. R.; FREY, K. G.; GIBBONS, H. S.; JAISSE, J.; KOROLEVA, G. I.; LADNER, J. T.; LO, C.-C.; MUNK, C.; PALACIOS, G. F.; REDDEN, C. L.; ROSENZWEIG, C. N.; SCHOLZ, M. B.; JOHNSON, S. L. Whole-Genome *Yersinia* sp. Assemblies from 10 Diverse Strains. **Genome Announcements**, v. 2, n. 5, p. e01055-14, 2014.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; FILIPELLO, V.; BOTTERO, M. T. Multiplex primer-extension assay for identification of *Yersinia* species. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 10, p. 6329–6333, 2014.

DE BOER, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 75–84, out. 1992.

DE KONING-WARD, T. F.; GRANT, T.; OPPEDISANO, F.; ROBINS-BROWNE, R. M. Effect of bacterial invasion of macrophages on the outcome of assays to assess bacterium-macrophage interactions. **Journal of Immunological Methods**, v. 215, n. 1–2, p. 39–44, 1998.

DE KONING-WARD, T. F.; ROBINS-BROWNE, R. M. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3790–5, out. 1995.

DHAR, M. S.; GUPTA, V.; VIRDI, J. S. Detection, Distribution and Characterization of Novel Superoxide Dismutases from *Yersinia enterocolitica* Biovar 1A. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2013.

DICKINSON, A. B.; MOCQUOT, G. STUDIES ON THE BACTERIAL FLORA OF THE ALIMENTARY TRACT OF PIGS. I. *ENTEROBACTERIACEAE* AND OTHER GRAM-NEGATIVE BACTERIA. **Journal of Applied Bacteriology**, v.24, p. 252–284, 1961.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5771, p. 212–7, 14 abr. 2006.

DRUMMOND, N.; MURPHY, B. P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M. B.; BUCKLEY, J. F.; FANNING, S. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne**

Pathogens and Disease, v. 9, n. 3, p. 179–89., 2012.

DU, D.; WANG, Z.; JAMES, N. R.; VOSS, J. E.; KLIMONT, E.; OHENE-AGYEI, T.; VENTER, H.; CHIU, W.; LUISI, B. F. Structure of the AcrAB – TolC multidrug efflux pump. **Nature**, 2014.

EFSA. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 9, n. 3, p. 2090, 2011.

EITEL, J.; HEISE, T.; THIESEN, U.; DERSCH, P. Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 63–77, 2005.

ELLISON, D. W.; YOUNG, B.; NELSON, K.; MILLER, V. L. YmoA Negatively Regulates Expression of Invasin from *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7153–7159, 2003.

ESSEVELD, H.; GOUDZWAARD, C. On the epidemiology of *Y. enterocolitica* infections: pigs as the source of infections in man. In: Winblad, S., ed. **Proceedings of the International Symposium on Yersinia, Pasteurella, and Francisella**, Malmd, April 1972. Basel, Karger, 1973, pp. 99-101 (Contributions to **Microbiology and Immunology**, vol. 2).

EVDOKIMOV, A. G.; TROPEA, J. E.; ROUTZAHN, K. M.; WAUGH, D. S. Crystal structure of the *Yersinia pestis* GTPase activator YopE. **Protein Science : a publication of the Protein Society**, v. 11, n. 2, p. 401–8, 2002.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 30, n. 1, p. 24–32, 2012.

FALCÃO, J. P.; BROCCHI, M.; PROENÇA-MÓDENA, J. L.; ACRANI, G. O.; CORRÊA, E. F.; FALCÃO, D. P. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 6, p. 1230–1236, 2004.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 9–19, 2006.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; PITONDO-SILVA, A.; MALASPINA, A. C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1539–1548, 2006.

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

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M.; MCKENNEY, K.; SUTTON, G.; FITZHUGH, W.; FIELDS, C.; GOCAYNE, J. D.; SCOTT, J.; SHIRLEY, R.; LIU, L. I.; GLODEK, A.; KELLEY, J. M.; WEIDMAN, J. F.; PHILLIPS, C. A.; SPRIGGS, T.; HEDBLUM, E.; COTTON, M. D.; UTTERBACK, T. R.; HANNA, M. C.; NGUYEN, D. T.; SAUDEK, D. M.; BRANDON, R. C.; FINE, L. D.; FRITCHMAN, J. L.; FUHRMANN, J. L.; GEOGHAGEN, N. S. M.; GNEHM, C. L.; MCDONALD, L. A.; SMALL, K. V.; FRASER, C. M.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus- Influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995.

FOURNIER, P.-E.; DUBOURG, G.; RAOULT, D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. **Genome Medicine**, v. 6, n. 11, p. 114, 2014.

FRAZÃO, M. R.; ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C.; FALCÃO, J. P. Antimicrobial resistance and plasmid replicons in *Yersinia enterocolitica* strains isolated in Brazil in 30 years. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 477–480, 2017.

FRAZÃO, M. R.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1058–1067, 2015.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; CERNELA, N.; HÄCHLER, H.; STEPHAN, R.

Yersinia enterocolitica strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1543–50, 2012.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; GERHARDT, M.; STOLLE, A. High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter. **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 334–336, 2009.

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. **Epidemiology and Infection**, v. 127, n. 1, p. 37–47, 2001.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KOCH, U.; KLEMM, C.; BUCHER, M.; STOLLE, A. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 89–94, 2004.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem. **Society**, v. 16, n. 2, p. 220–229, 2003.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; MEYER, C.; BONKE, R.; STÜBER, E.; WACHECK, S. Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 412–418, 2010.

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. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 132–137, 2003.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 315–329, 2006a.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; SIITONEN, A.; KORKEALA, H. Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 747–749, 2006b.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of

pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 207–212, 2007.

FUCHS, T. M.; BRANDT, K.; STARKE, M.; RATTEI, T. Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 168, 2011.

FUKUSHIMA, H.; GOMYODA, M.; ALEKSIC, S.; TSUBOKURA, M. Differentiation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:5,27 strains by phenotypic and molecular techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1672–1674, 1993.

FUKUSHIMA, H.; ITO, Y.; SAITO, K.; TSUBOKURA, M.; OTSUKI, K. Role of the fly in the transport of *Yersinia enterocolitica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1009–1010, 1979.

GADELHA, A.; ACCACIO, N.; GRINZSTEJN, B.; VELOSO, V.; DA SILVEIRA, L. B.; FANDINHO, F.; SAAD, M. H.; LOURENCO, M. C.; ROLLA, V. Low incidence of colonization and no cases of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection (DMAC) in Brazilian AIDS patients in the HAART era. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 252–257, 2002.

GALIMAND, M.; GUIYOULE, A.; GERBAUD, G.; RASOAMANANA, B.; CHANTEAU, S.; CARNIEL, E.; COURVALIN, P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 10, p. 677–80, 4 set. 1997.

GALINDO, C. L.; ROSENZWEIG, J. a; KIRTLEY, M. L.; CHOPRA, A. K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

GARZETTI, D.; HEESEMANN, J.; RAKIN, A. Genome Sequences of Four *Yersinia enterocolitica* Bioserotype 4/O:3 Isolates from Mammals. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. e00466-13-e00466-13, 11 jul. 2013.

GEMSKI, P.; LAZERE, J. R.; CASEY, T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 682–685, 1980.

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

GRAHEK-OGDEN, D.; SCHIMMER, B.; CUDJOE, K. S.; NYGÅRD, K.; KAPPERUD, G. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 754–756, 2007.

GROVES, E.; RITTINGER, K.; AMSTUTZ, M.; BERRY, S.; HOLDEN, D. W.; CORNELIS, G. R.; CARON, E. Sequestering of Rac by the *Yersinia* effector YopO blocks Fcγ receptor-mediated phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 4087–4098, 2010.

GRÜTZKAU, A.; HANSKI, C.; HAHN, H.; RIECKEN, E. O. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. **Gut**, v. 31, n. 9, p. 1011–5, 1990.

GU, W.; WANG, X.; QIU, H.; LUO, X.; XIAO, D.; XIAO, Y.; TANG, L.; KAN, B.; JING, H. Comparative antigenic proteins and proteomics of pathogenic *Yersinia enterocolitica* bio-serotypes 1B/O: 8 and 2/O: 9 cultured at 25°C and 37°C. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 9, p. 583–94, set. 2012.

GUPTA, S. K.; PADMANABHAN, B. R.; DIENE, S. M.; LOPEZ-ROJAS, R.; KEMPF, M.; LANDRAUD, L.; ROLAIN, J. M. ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 212–220, 2014.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.

HALL, M.; CHATTAWAY, M. A.; REUTER, S.; SAVIN, C.; STRAUCH, E.; CARNIEL, E.; CONNOR, T.; VAN DAMME, I.; RAJAKARUNA, L.; RAJENDRAM, D.; JENKINS, C.; THOMSON, N. R.; MCNALLY, A. Use of whole-genus genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 35–42, 2015.

HALLER, J. C.; CARLSON, S.; PEDERSON, K. J.; PIERSON, D. E. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1436–1446, 2000.

HAM, Y.; KIM, T.-J. Inhibitory activity of monoacylglycerols on biofilm formation in *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus mutans*, *Xanthomonas oryzae*, and *Yersinia enterocolitica*. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1526, 2016.

HAMMERL, J. A.; KLEIN, I.; LANKA, E.; APPEL, B.; HERTWIG, S. Genetic and functional properties of the self-transmissible *Yersinia enterocolitica* plasmid pYE854, which mobilizes the virulence plasmid pYV. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 991–1010, 2008.

HASMAN, H.; SAPUTRA, D.; SICHERITZ-PONTEN, T.; LUND, O.; SVENDSEN, C. A.; FRIMODT-MOLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 139–146, 2014.

HEISE, T.; DERSCH, P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3375–80, 2006.

HOICZYK, E.; ROGGENKAMP, A.; REICHENBECHER, M.; LUPAS, A.; HEESEMANN, J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. **The EMBO journal**, v. 19, n. 22, p. 5989–5999, 2000.

HOOTON, S. P. T.; TIMMS, A. R.; CUMMINGS, N. J.; MORETON, J.; WILSON, R.; CONNERTON, I. F. The complete plasmid sequences of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U288. **Plasmid**, v. 76, p. 32–39, 2014.

HUNT, M.; KIKUCHI, T.; SANDERS, M.; NEWBOLD, C.; BERRIMAN, M.; OTTO, T. D. REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. **Genome biology**, v. 14, n. 5, p. R47, 2013.

IBRAHIM, A.; GOEBEL, B. M.; LIESACK, W.; GRIFFITHS, M.; STACKEBRANDT, E. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, n. 2, p. 173–177, 1993.

IBRAHIM, A.; LIESACK, W.; GRIFFITHS, M. W.; ROBINS-BROWNE, R. M. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (yst). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1636–1638, 1997.

IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1302–1309, 1988.

INOUE, M.; DASHNOW, H.; RAVEN, L.-A.; SCHULTZ, M. B.; POPE, B. J.; TOMITA, T.; ZOBEL, J.; HOLT, K. E. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. **Genome Medicine**, v. 6, n. 11, p. 90, 2014.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G. R. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 738–744, 1995.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 915–929, 1998.

ISABEL, S.; LEBLANC, É.; BOISSINOT, M.; BOUDREAU, D. K.; GRONDIN, M.; PICARD, F. J.; MARTEL, E. A.; PARHAM, N. J.; CHAIN, P. S. G.; BADER, D. E.; MULVEY, M. R.; BRYDEN, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Divergence among genes encoding the elongation factor Tu of *Yersinia* species. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 22, p. 7548–7558, 2008.

ISBERG, R. R.; BARNES, P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 1, p. 21–28, 2001.

JOHNSON, J. K.; ARDUINO, S. M.; STINE, O. C.; JOHNSON, J. A.; HARRIS, A. D. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3707–3712, 2007.

JOHNSON, S. L.; DALIGAULT, H. E.; DAVENPORT, K. W.; JAISSE, J.; FREY, K. G.; LADNER, J. T.; BROOMALL, S. M.; BISHOP-LILLY, K. a; BRUCE, D. C.; COYNE, S. R.; GIBBONS, H. S.; LO, C.; MUNK, a C.; ROSENZWEIG, C. N.; KOROLEVA, G. I.; PALACIOS, G. F.; REDDEN, C. L.; XU, Y.; MINOGUE, T. D.; CHAIN, S.; TV, I.; DT, D.; DA, H.; JG, B.; MS, A.; EITZEN, E. Thirty-two complete

genome assemblies of nine *Yersinia* species, including *Y. pesits*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 3–4, 2015.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 595, 2010.

JOURDAN ALISSA, SCOTT C. JOHNSON, I. V. W. Development of a rapid fluorogenic 5' nuclease assay for the detection of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3750–3755, 2000.

JOUSSELIN, A.; MANZANO, C.; BIETTE, A.; REED, P.; PINHO, M. G.; ROSATO, A. E.; KELLEY, W. L.; RENZONI, A. The *Staphylococcus aureus* Chaperone PrsA Is a New Auxiliary Factor of Oxacillin Resistance Affecting Penicillin-Binding Protein 2A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1656–1666, mar. 2016.

JOUTSEN, S.; EKLUND, K.-M.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; STEPHAN, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 5/O:3 in the feces at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 197, p. 78–82, 25 dez. 2016.

KANAZAWA, Y.; KURAMATA, T. [Transmission of drug-resistance through conjugation in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. (II). With special reference to streptomycin resistant strains isolated from men and domestic animals (author's transl)]. **The Japanese Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 4, p. 538–41, ago. 1975.

KANTSØ, B.; ANDERSEN, A.-M. N.; MØLBAK, K.; KROGFELT, K. A.; HENRIKSEN, T. B.; NIELSEN, S. Y. *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Yersinia* antibodies and pregnancy outcome in Danish women with occupational exposure to animals. **International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 28, p. 74–9, nov. 2014.

KAPATRAL, V.; CAMPBELL, J. W.; MINNICH, S. A.; THOMSON, N. R.; MATSUMURA, P.; PRÜS, B. M. Gene arrays analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: Regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2289–2300, 2004.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299–

2301, 1988.

KETO-TIMONEN, R.; HIETALA, N.; PALONEN, E.; HAKAKORPI, A.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1151, 2016.

KIM, T. J.; YOUNG, B. M.; YOUNG, G. M. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5466–5474, 2008.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. **BioEssays**, v. 32, n. 6, p. 524–536, 2010.

KIRJAVAINEN, V.; JARVA, H.; BIEDZKA-SAREK, M.; BLOM, A. M.; SKURNIK, M.; MERI, S. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, 2008.

KIRK, O.; GATELL, J. M.; MOCROFT, A.; PEDERSEN, C.; PROENCA, R.; BRETTELE, R. P.; BARTON, S. E.; SUDRE, P.; PHILLIPS, A. N. Infections with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* among HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy. EuroSIDA Study Group JD. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 3 Pt 1, p. 865–72, set. 2000.

KOLMOGOROV, M.; RANEY, B.; PATEN, B.; PHAM, S. Ragout - A reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. **Bioinformatics**, v. 30, n. 12, p. 302–309, 2014.

KOTETISHVILI, M.; KREGER, A.; WAUTERS, G.; JR, G. M.; SULAKVELIDZE, A.; STINE, O. C.; MORRIS, J. G. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2674–2684, 2005.

KRAUSHAAR, B.; DIECKMANN, R.; WITWER, M.; KNABNER, D.; KONIETZNY, A.; MÄDE, D.; STRAUCH, E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an ail gene. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 997–1005, 2011.

LARSEN, M. V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R. L.; JELSBÄK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D. W.;

AARESTRUP, F. M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, 2012.

LÁZARO, N. dos S.; HOFER, E. ANTI -*Yersinia enterocolitica* SEROTYPE 3 AGGLUTININS IN SWINE SERA FROM RIO DE JANEIRO. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 121–123, 1996.

LEE, M.; HESEK, D.; BLÁZQUEZ, B.; LASTOCHKIN, E.; BOGGESS, B.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of *Pseudomonas aeruginosa*, a nexus for the induction of β -lactam antibiotic resistance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 1, p. 190–200, 14 jan. 2015a.

LEE, W. L.; GRIMES, J. M.; ROBINSON, R. C. *Yersinia* effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 248–55, 2015b.

LEISER, O. P.; MERKLEY, E. D.; CLOWERS, B. H.; DEATHERAGE KAISER, B. L.; LIN, A.; HUTCHISON, J. R.; MELVILLE, A. M.; WAGNER, D. M.; KEIM, P. S.; FOSTER, J. T.; KREUZER, H. W. Investigation of *Yersinia pestis* laboratory adaptation through a combined genomics and proteomics approach. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–24, 2015.

LESIC, B.; ZOUINE, M.; DUCOS-GALAND, M.; HUON, C.; ROSSO, M. L.; PRÉVOST, M. C.; MAZEL, D.; CARNIEL, E. A natural system of chromosome transfer in *Yersinia pseudotuberculosis*. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 3, 2012.

LI, W.; WEN, L.; LI, C.; CHEN, R.; YE, Z.; ZHAO, J.; PAN, J. Contribution of the outer membrane protein OmpW in *Escherichia coli* to complement resistance from binding to factor H. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 57–62, 2016.

LIANG, J.; WANG, X.; XIAO, Y.; CUI, Z.; XIA, S.; HAO, Q.; YANG, J.; LUO, L.; WANG, S.; LI, K.; YANG, H.; GU, W.; XU, J.; KAN, B.; JING, H. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2949–2956, 2012.

LILES, M. R.; EDELSTEIN, P. H.; CIANCIOTTO, N. P. The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 959–970, 1999.

LOGUE, C. M.; SHERIDAN, J. J.; WAUTERS, G.; MC DOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. *Yersinia* spp. and numbers, with particular reference to *Y. enterocolitica* bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 2–3, p. 257–274, 1996.

LOMAN, N. J.; MISRA, R. V.; DALLMAN, T. J.; CONSTANTINIDOU, C.; GHARBIA, S. E.; WAIN, J.; PALLEN, M. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 434–9, 2012.

LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. November, p. 1–9, 2015.

LONG, C.; JONES, T. F.; VUGIA, D. J.; SCHEFTEL, J.; STROCKBINE, N.; RYAN, P.; SHIFERAW, B.; TAUXE, R. V.; GOULD, L. H. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996-2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 566–7, mar. 2010.

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

MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 2957–2963, 2011.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–5, 1998.

MAKOVEICHUK, E.; CHEREPANOV, P.; LUNDBERG, S.; FORSBERG, A.; OLIVECRONA, G. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 320–330, 2003.

MENDONÇA, C. L.; LÁZARO, N. S.; DUQUE, V. M.; HOFER, E. Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos sadios, Rio de Janeiro. **Pesquisa**

Veterinária Brasileira, v. 15, n. 1, p. 11-14, 1995.

MENDONÇA, C.L.; LÁZARO, N.S.; HOFER, E.; ERNANDEZ, D.; DUQUE, V.M. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos na cidade do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 147-154, 1992.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

MEYSICK, K. C.; SEIDMAN, J.; FALCONIO, J. R. The *Yersinia pseudotuberculosis* YplA phospholipase differs in its activity, regulation and secretion from that of the *Yersinia enterocolitica* YplA. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 1, p. 24–32, 2009.

MICHIELS, T.; VANOOTEGHEM, J. C.; LAMBERT DE ROUVROIT, C.; CHINA, B.; GUSTIN, A.; BOUDRY, P.; CORNELIS, G. R. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 16, p. 4994–5009, 1991.

MIKULA, K. M.; KOLODZIEJCZYK, R.; GOLDMAN, A. *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. January, p. 169, 2012.

MILLER, V. L.; BLISKA, J. B.; FALKOW, S. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* gene and characterization of the Ail gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 1062–1069, 1990.

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

MÜHLENKAMP, M.; OBERHETTINGER, P.; LEO, J. C.; LINKE, D.; SCHÜTZ, M. S. *Yersinia* adhesin A (YadA) - Beauty & beast. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 2, p. 252–258, 2015.

NAJDENSKI, H.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; WERBROUCK, H.; VAN COILLIE, E. Quantification of *Yersinia enterocolitica* in raw milk using qPCR. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 3–4, p. 428–434, 2012.

NAKAJIMA, H.; INOUE, M.; MORI, T.; ITOH, K.; ARAKAWA, E.; WATANABE,

H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2484–6, 1992.

NAVARRO, L.; KOLLER, A.; NORDFELTH, R.; WOLF-WATZ, H.; TAYLOR, S.; DIXON, J. E. Identification of a Molecular Target for the *Yersinia* Protein Kinase A. **Molecular Cell**, v. 26, n. 4, p. 465–477, 2007.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HØIDAL, H. K.; RØTTERUD, O. J. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 231–240, 2003.

NEUBAUER, H.; ALEKSIC, S.; HENSEL, A.; FINKE, E. J.; MEYER, H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 290, n. 1, p. 61–4, 2000a.

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

NEUBAUER, H.; SAUER, T.; BECKER, H.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3366–3368, 1998.

NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. Detection of *Yersinia enterocolitica* Heat-stable Enterotoxin by Suckling Mouse Bioassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, n.4, p. 783-786, 1981.

NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. *Yersinia enterocolitica*: isolamento concomitante de fezes de humanos e cão. **Revista de Microbiologia** (São Paulo), v.17, n.3, p. 220-224, 1986.

NUNES, M.P.; TOLEDO, M.R.F.; RICCIARDI, I.D. Invasibilidade e enterotoxigenicidade de *Yersinia enterocolitica* e das espécies atípicas de *Yersinia* isoladas do homem e de cães no Brasil. **Revista de Microbiologia** (São Paulo), v.15, p. 222-226, 1984.

OELLERICH, M. F.; JACOBI, C. A.; FREUND, S.; NIEDUNG, K.; BACH, A.; HEESEMANN, J.; TRÜLZSCH, K. *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal

invasion and abscess formation. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3802–3811, 2007.

ORTIZ MARTÍNEZ, P.; MYLONA, S.; DRAKE, I.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; CORRY, J. E. L. Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 64–69, 2010.

PAAUW, A.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; VAN KESSEL, K. P. M.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, 2009.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; FERREIRA, T. S. P.; SPINDOLA, M. G.; HOFER, E.; FALAVINA DOS REIS, C. M.; MATTÉ, M. H.; MICKE MORENO, A. Genotypic Characterization of *Yersinia enterocolitica* Biotype 4/O:3 Isolates from Pigs and Slaughterhouses Using SE-AFLP, ERIC-PCR, and PFGE. **Journal of Pathogens**, v. 2013, p. 521510, 2013a.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; HOFER, E.; MATTÉ, M. H.; FERREIRA, T. S. P.; GOMES, V. T. D. M.; COSTA, B. L. P.; MORENO, A. M. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013b.

PARADIS, S.; BOISSINOT, M.; PAQUETTE, N.; BÉLANGER, S. D.; MARTEL, E. A.; BOUDREAU, D. K.; PICARD, F. J.; OUELLETTE, M.; ROY, P. H.; BERGERON, M. G. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2013–2025, 2005.

PASTINEN, T.; KURG, A.; METSPALU, A.; PELTONEN, L.; SYVÄNEN, A. C. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. **Genome Research**, v. 7, n. 6, p. 606–14, jun. 1997.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, v. 33 Suppl, n. march, p. 311–23, 2003.

PAULINO, D.; WARREN, R. L.; VANDERVALK, B. P.; RAYMOND, A.; JACKMAN, S. D.; BIROL, I. Sealer: a scalable gap-closing application for finishing draft genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 230, 2015.

PEIXOTTO, S. S.; FINNE, G.; HANNA, M. O.; VANDERZANT, C. Presence, Growth and Survival of *Yersinia enterocolitica* in Oysters, Shrimp and Crab. **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 12, p. 974–981, 1979.

PERUZY, M. F.; MURRU, N.; PERUGINI, A. G.; CAPUANO, F.; DELIBATO, E.; MERCOGLIANO, R.; KORKEALA, H.; PROROGA, Y. T. R. Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 65, p. 231–235, ago. 2017.

PHADTARE, S.; SEVERINOV, K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. **RNA Biology**, v. 7, n. 6, p. 788–95, 2010.

PHAM, J. N.; BELL, S. M.; HARDY, M. J.; MARTIN, L.; GUIYOULE, A.; CARNIEL, E. Susceptibility to beta-lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 9–13, jul. 1995.

PIERSON, D. E.; FALKOW, S. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 1846–1852, 1993.

PILON, J.; HIGGINS, R.; QUESSY, S. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Québec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 5, p. 383–387, 2000.

PLATT-SAMORAJ, A.; SZWEDA, W.; PROCAJLO, Z. The influence of experimental *Yersinia enterocolitica* infection on the pregnancy course in sows--preliminary studies. I. Bacteriological examination. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, n. 3, p. 317–322, 2009.

PORCHERON, G.; GARÉNAUX, A.; PROULX, J.; SABRI, M.; DOZOIS, C. M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. December, p. 24 p, 2013.

PUJOL, C.; BLISKA, J. B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: Subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3 SPEC.

ISS., p. 216–226, 2005.

QUINTÁNS, B.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, V.; SALAS, A.; PHILLIPS, C.; LAREU, M. V.; CARRACEDO, A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. **Forensic Science International**, v. 140, n. 2–3, p. 251–257, 2004.

RAHUMA, N.; GHENGHESH, K. S.; BEN AISSA, R.; ELAMAARI, a. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 8, p. 795–802, 2005.

RAMAMURTHY, T.; YOSHINO, K.; HUANG, X.; BALAKRISH NAIR, G.; CARNIEL, E.; MARUYAMA, T.; FUKUSHIMA, H.; TAKEDA, T. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. **Microbial Pathogenesis**, v. 23, n. 4, p. 189–200, 1997.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, O. F.; ANDERSEN, J. K.; OLSEN, J. E. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 2, p. 99–108, abr. 1994.

REUTER, S.; CONNOR, T. R.; BARQUIST, L.; WALKER, D.; FELTWELL, T.; HARRIS, S. R.; FOOKES, M.; HALL, M. E.; PETTY, N. K.; FUCHS, T. M.; CORANDER, J.; DUFOUR, M.; RINGWOOD, T.; SAVIN, C.; BOUCHIER, C.; MARTIN, L.; MIETTINEN, M.; SHUBIN, M.; RIEHM, J. M.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; SIHVONEN, L. M.; SIITONEN, A.; SKURNIK, M.; FALCÃO, J. P.; FUKUSHIMA, H.; SCHOLZ, H. C.; PRENTICE, M. B.; WREN, B. W.; PARKHILL, J.; CARNIEL, E.; ACHTMAN, M.; MCNALLY, A.; THOMSON, N. R. Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 18, p. 6768–6773, 2014.

REVELL, P. A.; MILLER, V. L. *Yersinia* virulence: More than a plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 159-164, 2001.

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

ROBINS-BROWNE, R. M. *Yersinia enterocolitica*. In: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition**. [s.l.] American Society of Microbiology, p. 293–322, 2007.

ROSNER, B. M.; STARK, K.; WERBER, D. Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. **BMC public health**, v. 10, p. 337, 14 jun. 2010.

RUSAK, L. A.; MOURA FALAVINA DOS REIS, C.; BARBOSA, A. V.; FELIPE MERCÊS SANTOS, A.; PAIXÃO, R.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M. D. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 1533–1540, 2014.

RYABOVA, N. a; MARCHENKOV, V. V; MARCHENKOVA, S. Y.; KOTOVA, N. V; SEMISOTNOV, G. V. Molecular Chaperone GroEL/ES: Unfolding and Refolding Processes. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 78, n. 13, p. 1405–14, 2013.

SABINA, Y.; RAHMAN, A.; RAY, R. C.; MONTET, D. *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

SACHDEVA, P.; VIRDI, J. S. Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 193–201, 2004.

SAINSBURY, S.; BIRD, L.; RAO, V.; SHEPHERD, S. M.; STUART, D. I.; HUNTER, W. N.; OWENS, R. J.; REN, J. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of native and antibiotic-bound forms. **Journal of Molecular Biology**, v. 405, n. 1, p. 173–184, 2011.

SAUVAGE, E.; KERFF, F.; TERRAK, M.; AYALA, J. A.; CHARLIER, P. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 234–258, 2008.

SAVIN, C.; FRANGEUL, L.; MA, L.; BOUCHIER, C.; MOSZER, I.; CARNIEL, E. Draft Genome Sequence of a Clinical Strain of *Yersinia enterocolitica* (IP10393) of

Bioserotype 4/O:3 from France. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. 5–6, 2013.

SAVIN, C.; MARTIN, L.; BOUCHIER, C.; FILALI, S.; CHENAU, J. Ô.; ZHOU, Z.; BECHER, F.; FUKUSHIMA, H.; THOMSON, N. R.; SCHOLZ, H. C.; CARNIEL, E. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 452–463, 2014.

SCHIEMANN, D. A. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 1298–1304, 1979.

SCHMIDT, G. *Yersinia enterocolitica* outer protein T (YopT). **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 11, p. 955–958, 2011.

SCHMIEL, D. H.; YOUNG, G. M.; MILLER, V. L. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 8, p. 2314–2320, 2000.

SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. MALDI Imaging Mass Spectrometry - Painting Molecular Pictures. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 6, p. 529–538, dez. 2010.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.-E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 49, n. 4, p. 543–51, 2009.

SEOANE, A.; GARCÍA LOBO, J. M. Identification of a streptogramin acetyltransferase gene in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 905–909, 2000.

SEOL, J. H.; WOO, S. K.; JUNG, E. M.; YOO, S. J.; LEE, C. S.; KIM, K. J.; TANAKA, K.; ICHIHARA, A.; HA, D. B.; CHUNG, C. H. Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the *htrA* gene product. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, n. 2, p. 730–6, 30 abr. 1991.

SHARMA, N. K.; DOYLE, P. W.; GERBASI, S. A.; JESSOP, J. H. Identification of *Yersinia* species by the API 20E. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1443–1444, 1990.

SIHVONEN, L. M.; TOIVONEN, S.; HAUKKA, K.; KUUSI, M.; SKURNIK, M.; SIITONEN, A. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 42, 2011.

SKURNIK, M.; BOLIN, I.; HEIKKINEN, H. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 3, p. 1033–1036, 1984.

SMITH, J. D.; KUMARASIRI, M.; ZHANG, W.; HESEK, D.; LEE, M.; TOTH, M.; VAKULENKO, S.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S.; CHEN, Y. Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in β -lactam resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3137–46, jul. 2013.

SOULAS, C.; BAUSSANT, T.; AUBRY, J. P.; DELNESTE, Y.; BARILLAT, N.; CARON, G.; RENNO, T.; BONNEFOY, J. Y.; JEANNIN, P. Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 5, p. 2335–40, 1 set. 2000.

STENKOVA, A. M.; ISAEVA, M. P.; SHUBIN, F. N.; RASSKAZOV, V. A.; RAKIN, A. V. Trends of the major porin gene (ompF) evolution: Insight from the genus *Yersinia*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2011.

STOJILJKOVIC, I.; HANTKE, K. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 12, p. 4359–4367, 1992.

SWAMINATHAN, B.; HARMON, M. C.; MEHLMAN, I. J. A Review *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, p. 151–183, fev. 1982.

TADESSE, D. A.; BAHNSON, P. B.; FUNK, J. A.; MORROW, W. E. M.; ABLEY, M. J.; PONTE, V. A.; THAKUR, S.; WITTUM, T.; DEGRAVES, F. J.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GEBREYES, W. A. *Yersinia enterocolitica* of Porcine Origin: Carriage of Virulence Genes and Genotypic Diversity. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 1, p.

80–86, 2013.

TAN, S. Y.; DUTTA, A.; JAKUBOVICS, N. S.; ANG, M. Y.; SIOW, C. C.; MUTHA, N. V.; HEYDARI, H.; WEE, W. Y.; WONG, G. J.; CHOO, S. W. YersiniaBase: a genomic resource and analysis platform for comparative analysis of *Yersinia*. **BMC Bioinformatics**, v. 16, p. 9, 2015.

TAUXE, R.; VANDEPITTE, J.; WAUTERS, G.; MARTIN, S.; GOOSSENS, V.; DE MOL, P.; VAN NOYEN, R.; THIERS, G. *YERSINIA ENTEROCOLITICA* INFECTIONS AND PORK: THE MISSING LINK. **The Lancet**, v. 329, n. 8542, p. 1129–1132, 1986.

TENNANT, S. M.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 127–137, 2003.

THIBODEAU, V.; FROST, E. H.; CHÉNIER, S.; QUESSY, S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 96–100, 1999.

THISTED LAMBERTZ, S.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAD, M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6060–6067, 2008.

THOERNER, P.; KINGOMBE, C. I. Bin; WASSENAAR, T. M.; FREY, J.; JEMMI, T.; BO, K. PCR Detection of Virulence Genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence Gene Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1810–6, 2003.

TOIVANEN, P.; TOIVANEN, A.; OLKKONEN, L.; AANTAA, S. Hospital outbreak of *Yersinia enterocolitica* infection. **Lancet**, v. 1, n. 7807, p. 801–803, 1973.

TROSKY, J. E.; LIVERMAN, A. D. B.; ORTH, K. *Yersinia* outer proteins: Yops. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 557–565, 2008.

VAIPHEI, S. T.; TANG, Y.; MONTELIONE, G. T.; INOUYE, M. The use of the condensed single protein production system for isotope-labeled outer membrane proteins, OmpA and OmpX in *E. coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 205–210, 2011.

VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. *YERSINIA* OUTER PROTEINS: Role in Modulation

of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 69–89, 2005.

VIRDI, J. S.; SACHDEVA, P. Molecular heterogeneity in *Yersinia enterocolitica* and “*Y. enterocolitica*-like” species - Implications for epidemiology, typing and taxonomy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2005.

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

VON ALTROCK, A.; SEINIGE, D.; KEHRENBURG, C. *Yersinia enterocolitica* isolates from wild boars hunted in Lower Saxony, Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4835–4840, 2015.

VON TILS, D.; BLÄDEL, I.; SCHMIDT, M. A.; HEUSIPP, G. Type II secretion in *Yersinia* - a secretion system for pathogenicity and environmental fitness. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. December, p. 160, 2012.

VOSTRIKOVA, O. P.; ISAEVA, M. P.; LIKHATSKAYA, G. N.; NOVIKOVA, O. D.; KIM, N. Y.; KHOMENKO, V. A.; SOLOV’EVA, T. F. OmpC-like porin from outer membrane of *Yersinia enterocolitica*: molecular structure and functional activity. **Biochemistry**, v. 78, n. 5, p. 496–504, 2013.

WAGNER, N. J.; LIN, C. P.; BORST, L. B.; MILLERA, V. L. YaxAB, a *Yersinia enterocolitica* pore-forming toxin regulated by RovA. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 4208–4219, 2013.

WALKER, B. J.; ABEEL, T.; SHEA, T.; PRIEST, M.; ABOUELLIEL, A.; SAKTHIKUMAR, S.; CUOMO, C. A.; ZENG, Q.; WORTMAN, J.; YOUNG, S. K.; EARL, A. M. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

WANG, J. -Z.; DUAN, R.; LIANG, J. -R.; HUANG, Y.; XIAO, Y. -C.; QIU, H. -Y.; WANG, X.; JING, H. -Q. Real-Time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* Detection Based on the *ail* and *foxA* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4443–4444, 2014.

WANG, X.; LI, Y.; JING, H.; REN, Y.; ZHOU, Z.; WANG, S.; KAN, B.; XU, J.; WANG, L. Complete genome sequence of a *Yersinia enterocolitica* “old world” (3/o:9) strain and comparison with the “new world” (1B/O:8) strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1251–1259, 2011.

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

WEYNANTS, V.; JADOT, V.; DENOEL, P. A.; TIBOR, A.; LETESSON, J. J.; WEYNANTS, V.; JADOT, V.; DENOEL, P. A.; TIBOR, A. Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O : 3 by a PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 5–9, 1996.

WINBLAD, S. Studies on serological typing of *Yersinia enterocolitica*. **Acta Pathogen Microbiology Scandinavi**, v.187, p. 115, 1967.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. a. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17162–7, 2004.

WIŚNIEWSKI, J. R.; RAKUS, D. Multi-enzyme digestion FASP and the “Total Protein Approach”-based absolute quantification of the *Escherichia coli* proteome. **Journal of Proteomics**, v. 109, p. 322–331, 2014a.

WIŚNIEWSKI, J. R.; RAKUS, D. Quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome. **Data in Brief**, v. 1, p. 7–11, 2014b.

WOLFFS, P.; KNUTSSON, R.; NORLING, B.; RADSTROM, P. Rapid Quantification of *Yersinia enterocolitica* in Pork Samples by a Novel Sample Preparation Method , Flotation , Prior to Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1042–47, 2004.

WOLFFS, P.; NORLING, B.; RÅDSTRÖM, P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, n. 3, p. 315–323, 2005.

WREN, B. W.; TABAQCHALI, S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. **The Lancet**, v. 337, n. 8739, p. 496–497, 1991.

YAN, A.; GUAN, Z.; RAETZ, C. R. H. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 36077–36089, 2007.

YANG, R.; RYAN, U.; GARDNER, G.; CARMICHAEL, I.; CAMPBELL, A.; JACOBSON, C. Prevalence, faecal shedding and genetic characterisation of *Yersinia* spp. in sheep across four states of Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 94, n. 5, p. 129–37, maio 2016.

YANG, Y.; ISBERG, R. R. Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 499–510, 1997.

YE, Y. W.; LING, N.; HAN, Y. J.; WU, Q. P. Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the virF and ail genes. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6785–91, 2014.

YOUNG, B. M.; YOUNG, G. M. Yp1A is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 5, p. 1324–1334, 2002.

YOUNG, G. M.; BADGER, J. L.; MILLER, V. L. Motility Is Required To Initiate Host Cell Invasion by *Yersinia enterocolitica* Motility Is Required To Initiate Host Cell Invasion by *Yersinia enterocolitica*. **Infection**, v. 68, n. 7, p. 4323–4326, 2000.

YOUNG, G. M.; SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6456–6461, 1999.

ZHENG, H.; SUN, Y.; MAO, Z.; JIANG, B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 368–374, 2008.

ZHENG, H.; WANG, J.; SUN, Y.; JIANG, B. Clinical isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* in China using real-time PCR and culture method. **Digestion**, v. 75, n. 4, p. 199–204, 2007.

Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil

Leonardo Alves Rusak^{1,2}, Cristhiane Moura Falavina dos Reis², André Victor Barbosa³, André Felipe Mercês Santos⁴, Renata Paixão⁵, Ernesto Hofer², Deyse Christina Vallim², Marise Dutra Asensi¹

¹ Fiocruz – Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – LAPIH, Rio de Janeiro, Brasil

² Fiocruz – Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Setor Listeria – LABZOO, Rio de Janeiro, Brasil

³ Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Instituto Biomédico, Niterói, Brasil

⁴ Fiocruz – Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional em Cólera e outras enterobactérias, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil

Abstract

Introduction: *Yersinia enterocolitica* is a well-known foodborne pathogen widely distributed in nature with high public health relevance, especially in Europe.

Methodology: This study aimed to analyze the pathogenic potential of *Y. enterocolitica* isolated strains from human, animal, food, and environmental sources and from different regions of Brazil by detecting virulence genes *inv*, *ail*, *ystA*, and *virF* through polymerase chain reaction (PCR), phenotypic tests, and antimicrobial susceptibility analysis. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for the assessment of phylogenetic diversity.

Results: All virulence genes were detected in 11/60 (18%) strains of serotype O:3, biotype 4 isolated from human and animal sources. Ten human strains (4/O:3) presented three chromosomal virulence genes, and nine strains of biotype 1A presented the *inv* gene. Six (10%) strains were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim, seven (12%) to tetracycline, and one (2%) to amikacin, all of which are used to treat yersiniosis. AMP-CEF-SXT was the predominant resistance profile. PFGE analysis revealed 36 unique pulsotypes, grouped into nine clusters (A to I) with similarity $\geq 85\%$, generating a diversity discriminatory index of 0.957. Cluster A comprised all bio-serotype 4/O:3 strains isolated from animal and humans sources.

Conclusions: This study shows the existence of strains with the same genotypic profiles, bearing all virulence genes, from human and animal sources, circulating among several Brazilian states. This supports the hypothesis that swine is likely to serve as a main element in *Y. enterocolitica* transmission to humans in Brazil, and it could become a potential threat to public health as in Europe.

Key words: *Yersinia*; zoonosis; antibiotics; PCR; PFGE.

J Infect Dev Ctries 2014; 8(12):1533-1540. doi:10.3855/jidc.4533

(Received 30 December 2013 – Accepted 13 August 2014)

Copyright © 2014 Rusak *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Yersinia enterocolitica was of clinical and epidemiological interest in the 1970s, evidenced by the significant increase of studies published around the world [1]. It is widely distributed in nature in aquatic and animal reservoirs, with swine serving as a major reservoir for human pathogenic strains [2]. Yersiniosis is a zoonotic bacterial disease with high public health relevance, especially in Europe due to its high levels of occurrence, where it is the third most common bacterial enteric disease [3-4].

In Brazil, several studies on *Y. enterocolitica* and other *Yersinia* species show its isolation from human, animal, food, and environmental sources; occurrences

are most frequently reported in sporadic cases [5]. Brazil does not have official data about the incidence of this pathogen. The sporadic cases have been reported in only a few studies that have been published in scientific journals around the world.

Regarding clinical aspects, *Y. enterocolitica* O:3 may cause a variety of gastrointestinal problems, such as acute diarrhea, terminal ileitis, and mesenteric lymphadenitis. The pathogenicity and virulence mechanisms are still complex, and various chromosomal and extra-chromosomal factors have already been described [2]. The *ail*, *inv*, and *yst* genes, located in the chromosome of pathogenic *Y. enterocolitica* strains, are the most frequently used

chromosomal targets [6]. The *inv* (invasive gene) and *ail* (attachment invasion locus) genes are responsible for the production of an invasin and an outer membrane protein called Ail, respectively, which enable the bacteria translocation through the intestinal epithelium, cell fixation, and subsequent invasion. The role of the *ystA* gene (yersinia stable toxin) in the production of thermostable enterotoxin, causing diarrhea, has also been emphasized [7].

Another virulence factor in *Y. enterocolitica* O:3 is a plasmid called pYV (plasmid *Yersinia* virulence) [8]. It allows the microorganism to survive and multiply in lymphatic tissues and encodes the production of several proteins called Yops (*Yersinia* outer proteins). They play a major role in yersinial virulence, whose effects on macrophages and polymorphonuclear leukocytes include the inhibition of phagocytosis and respiratory burst [2]. In plasmids, the locus *virF* contains information on Yops transcription [9].

In the last decades, several different DNA-based methods for epidemiological typing have been used in epidemiological outbreak studies of *Y. enterocolitica* [5]. PFGE is the gold standard for bacteria and is used both for studies of hospital outbreaks and for the comparison of bacterial populations involving microorganisms of different countries or regions [10].

The aim of this study was to analyze the virulence genes, antimicrobial susceptibility behavior, and genotypes of *Y. enterocolitica* Brazilian strains isolated from humans and animals, which could act as a reservoir and a transmission route.

Methodology

Bacterial strains and bacteriological analysis

A total of 60 *Y. enterocolitica* strains were randomly selected. The isolate sources included 31 strains from tonsillar and tongue surfaces of healthy swine; 10 from slaughterhouses in Campinas city isolated between 2007 and 2008; 5 strains from food isolated in São Paulo state (SP) (2008–2011); and 14 isolates from humans with various clinical circumstances coming from Bahia (BA), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), and Santa Catarina states (SC) between 2005 and 2011.

The strains belonged to the *Listeria* collection (CLIST), Laboratory of Bacterial Zoonosis at Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Y. enterocolitica biotyping was performed according to Wauters (1981) [11] and Mollaret *et al.* (1990) [12]. Serotyping was performed by slide agglutination and typed according to Wimblad's

(1968) [13] O antisera system prepared in rabbits in the laboratory [14].

Phenotypic tests for detection of virulent plasmid

To assess the presence of the virulent plasmid, the following phenotypic tests were performed: autoagglutination phenotypic tests at 37°C [15], binding of crystal violet [16], absorption of Congo red in the Congo red-magnesium oxalate agar medium (CRMOX) [17], and the activity of pyrazinamidase [18]. All phenotypic tests, except for the pyrazinamidase activity test, were performed at 28°C and 37°C.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility tests were carried out using the disk diffusion method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011 [19]. Twelve antimicrobials (Oxoid, Basingstoke, UK) were tested: ampicillin (AMP) 10 µg, cephalotin 30 µg (CEF), cefoxitin (FOX) 30 µg, amikacin (AMK) 30 mg, sulfamethoxazole (SFT) 25 µg, gentamicin (GEN) 10 µg, tetracycline (TET) 30 µg, chloramphenicol (CLO) 30 µg, imipenem (IPM) 10 µg, sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT) 25 µg, ciprofloxacin (CIP) 5 µg, and trimethoprim (TMP) 5 µg. The reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as the quality control of all antimicrobials. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was used as the quality control for amikacin and ciprofloxacin.

Detection of virulence genes

The presence of *inv*, *ail*, *virF*, and *ystA* genes was analyzed through polymerase chain reaction (PCR) with their respective primers (Table 1) using Platinum PCR Super Mix Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). The conditions for performing PCR reactions were followed according to the reference of each gene in Table 1. DNA extraction was performed using a DNA extraction kit (DNeasy Blood & Tissue Kit; Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's guidelines.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE was performed according to the methodology recommended by Pulsenet [23] for *Yersinia pestis*. The cell suspension of the strains was made with cell suspension buffer (CSB – 100 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 8.0). The agarose plugs were made with 400 µL of 1% SeaKem Gold (Cambrex, Rockland, USA) and 1% SDS agarose.

Table 1. Primers of virulence genes *inv*, *ail*, *ystA* and *virF* and their respective amplicon

Gene	Name	Sequence (5'–3')	Amplicon (bp)	Reference
<i>inv</i>	YC1 (F)	CTG TGG GGA GAG TGG GGA AGT TTG G	570	Rasmussen et al. (1994) [20]
	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 et al. (1992) [21]
	Ail2 (R)	CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG		
<i>ystA</i>	Pr2a (F)	A ATG CTG TCT TCA TTT GGA GCA	145	Ibrahim et al. (1997) [22]
	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) [9]
	VirF2 (F)	ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG		

Table 2. Results of antimicrobial resistance (AR), PCR of virulence genes and phenotypic tests of 60 *Y. enterocolitica* strains analyzed

Strain	Source	Date	AR	Virulence genes	Phenotypic tests	Serotype / Biotype
YE1	Animal	2007	AMP, CEF, SFT, TET, SXT	-	CV	O:3/4
YE2	Animal	2007	AMP, CEF	-	CV	O:3/4
YE3	Animal	2007	AMP, CEF, SFT, TET	-	-	O:3/4
YE4	Animal	2007	AMP, CEF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE5	Animal	2007	AMP, CEF, SXT, TMP	-	-	O:3/4
YE6	Animal	2007	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE7	Animal	2007	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE8	Animal	2007	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE9	Animal	2007	AMP, CEF, SFT, TET	-	CRMOX	O:3/4
YE10	Animal	2007	AMP, CEF, SFT,	-	-	O:3/4
YE11	Animal	2007	AMP, CEF, SFT,	-	-	O:3/4
YE12	Animal	2007	AMP, CEF, AMK, SFT,	-	-	O:3/4
YE13	Animal	2007	AMP, CEF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE14	Animal	2007	AMP, CEF, SFT,	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE15	Animal	2007	AMP, CEF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE16	Animal	2008	AMP, CEF	-	CRMOX	O:3/4
YE17	Animal	2008	AMP, CEF, TET, SXT	-	-	O:3/4
YE18	Animal	2008	AMP, CEF	-	CRMOX	O:3/4
YE19	Animal	2008	AMP, CEF, SFT	-	CRMOX	O:3/4
YE20	Animal	2008	AMP, CEF, SFT, TET	-	CRMOX	O:3/4
YE21	Animal	2008	AMP, CEF, SFT	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE22	Animal	2008	AMP	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE23	Animal	2008	AMP, CEF, SFT	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE24	Animal	2008	AMP, CEF	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE25	Animal	2008	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE26	Animal	2008	AMP, SFT	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE27	Animal	2008	AMP, CEF	-	CRMOX	O:3/4
YE28	Animal	2008	AMP, CEF, SFT	-	CRMOX	O:3/4
YE29	Food	2008	AMP, CEF, SFT, SXT, TMP	-	CRMOX	O:3/4
YE30	Food	2008	AMP, CEF, SFT, SXT, TMP	-	-	O:3/4
YE31	Human	2008	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE32	Human	2005	AMP, CEF, SFT	-	-	O:3/4
YE33	Animal	2007	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	5a/1A
YE34	Environment	2007	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	5a/1A
YE35	Environment	2007	AMP, CEF	<i>inv</i>	PYZ	5b/1A
YE36	Animal	2007	AMP, CEF, SFT	-	PYZ	NT/1A
YE37	Environment	2007	AMP, CEF, SFT	-	PYZ	NT/1A
YE38	Environment	2007	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	NT/1A
YE39	Environment	2007	AMP, CEF	-	PYZ	NT/1A

(continue on next page)

Table 2. (continued) Results of antimicrobial resistance (AR), PCR of virulence genes and phenotypic tests of 60 *Y. enterocolitica* strains analyzed

Strain	Source	Date	AR	Virulence genes	Phenotypic tests	Serotype / Biotype
YE40	Environment	2008	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE41	Environment	2007	AMP, CEF,SFT	-	PYZ	NT/1A
YE42	Animal	2007	AMP, CEF,FOX, SFT, TET	-	PYZ	NT/1A
YE43	Environment	2007	AMP, CEF	-	PYZ	NT/1A
YE44	Environment	2007	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	NT/1A
YE45	Environment	2007	AMP, CEF	<i>inv</i>	PYZ	O:7/1A
YE46	Human	2008	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE47	Human	2008	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE48	Human	2008	AMP, CEF, SFT, SXT, TMP	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE49	Human	2009	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	Autoag, CV	O:3/4
YE50	Human	2009	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE51	Human	2009	AMP, CEF,SFT, TET	<i>inv, ail, ystA</i>	CV	O:3/4
YE52	Human	2010	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE53	Human	2010	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE54	Food	2011	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	5b/1A
YE55	Food	2011	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	5b/1A
YE56	Food	2011	AMP, CEF, FOX, SFT	<i>inv</i>	PYZ	5b/1A
YE57	Human	2011	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE58	Human	2011	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA, virF</i>	Autoag, CV, CRMOX	O:3/4
YE59	Human	2011	AMP, CEF,SFT, TMP	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4
YE60	Human	2011	AMP, CEF,SFT	<i>inv, ail, ystA</i>	-	O:3/4

AR: antimicrobial resistance; AMP: ampicillin; CEF: cephalotin; AMK: amikacin; FOX: cefoxitin; SFT: sulfamethoxazole; TET: tetracycline; SXT: sulfamethoxazole-trimethoprim; TMP: trimethoprim; Autoag: autoagglutination; CV: crystal violet; CRMOX: Congo red agar - magnesium oxalate; PYZ: pyrazinamidase activity at 37°C; NT: not serologically typed

Table 3. Resistance profiles of 60 isolated strains of *Y. enterocolitica*

Resistance profiles	Total	Serotype				
		O:3	5a	5b	O:7	NT/1A
AMP	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF	12	8	-	1	1	2
AMP-SFT	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-SFT	26	23	-	-	-	3
AMP-CEF-SFT-TET	4	4	-	-	-	-
AMP-CEF-AMK-SFT	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-TET-SXT	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-SFT-TMP	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-SXT-TMP	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-SFT-TET-SXT	1	1	-	-	-	-
AMP-CEF-FOX-SFT	7	-	2	3	-	2
AMP-CEF-SFT-SXT-TMP	3	3	-	-	-	-
AMP-CEF-FOX-SFT-TET	1	-	-	-	-	1
Total	60	45	2	4	1	8

AMP: ampicillin; CEF: cephalotin; AMK: amikacin; FOX: cefoxitin; SFT: sulfamethoxazole; TET: tetracycline; SXT: sulfamethoxazole-trimethoprim; TMP: trimethoprim.

Cell lysis buffer (CLB – 50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH 8.0 + sarcosyl 1%) and 25 µL of proteinase K (20 mg/mL stock (Invitrogen, Carlsbad, USA) were used for the cell lysis. The plugs were washed with sterile Ultrapure water (reagent grade type 1; Mili-Q, Darmstadt, Germany) and TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0).

The plugs were digested with 10U/µL Not I (BioLabs, Ipswich, USA) and the electrophoresis system was CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, USA). The gel was stained with ethidium bromide solution (0.5 µg/mL) and visualized by UV light. The molecular weight standard used was *Salmonella* serovar Braenderup H9812.

Data analysis was performed with BioNumerics version 4 (Applied Math, Austin, USA). Banding patterns were compared through the Dice coefficient by using the UPGMA method (unweighted pair group method with averages) to determine the similarity of bands and by adopting Tenover *et al.*'s [24] criterion in the definition of cluster types. A cut-off ≥ 85% was set forth in formation of groups considered genetically related. However, isolated strains with the 100% band patterns of similarity were considered to be representatives of the same pulsotype of PFGE [25]. For the assessment of the PFGE discriminatory capacity, the calculation of the Simpson's index of diversity was used [26].

Results

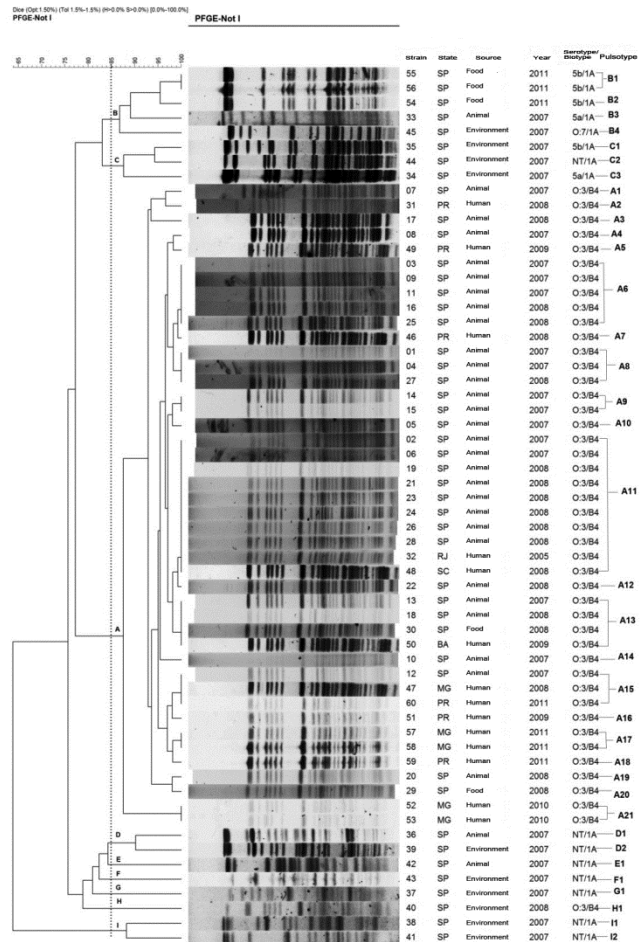
The data obtained in phenotypic tests, in antimicrobial resistance behavior (AR), and in PCR of virulence genes are listed in Table 2. Eleven positive strains in the phenotypic tests, except for pyrazinamidase activity, presented all virulence genes, including the plasmid gene *virF*, confirming the presence of the plasmid in nine animal and two human isolate strains, since the strain was only considered as the plasmid bearer when phenotypic tests and the PCR test for detection of *virF* gene were positive. The strains belonging to biotype 1A were positive for pyrazinamidase activity. Ten strains isolated from human sources (O:3/4) presented only three chromosomal virulence genes and nine strains belonging to biotype 1A presented the *inv* gene.

Antimicrobial susceptibility test revealed the high resistance of *Y. enterocolitica* to ampicillin (100%) and cephalotin (97%) in addition to the behavior of isolated strains in relation to other drugs. In terms of the resistance profiles of the strains, 8 (13%) were resistant to cefoxitin, 41 (68%) to sulfamethoxazole, 6 (10%) to sulfamethoxazole-trimethoprim, 5 (8%) to

trimethoprim, 7 (12%) to tetracycline, and 1 (2%) to amikacin. The predominant resistance profile was AMP-CEF-SXT (Table 3).

The PFGE analysis provided elements for the preparation of a dendrogram, consisting of nine clusters (A to I), allowing the grouping of the isolated strains with ≥ 85% similarity. Within the clusters, 36 isolated strains had pulsotype with 100% similarity, as shown in Figure 1. Cluster A comprised all serotype strains O:3 biotype 4 isolated from animal and human sources. The strains belonging to biotype 1A from food and environmental sources were spread throughout the others clusters (B to I).

Figure 1. PFGE dendrogram. Dendrogram built from the analysis of the bands, generating nine clusters (A to I) with similarity ≥ 85%, of 60 *Y. enterocolitica* strains obtained by PFGE.



SP: São Paulo; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; SC: Santa Catarina; BA: Bahia; MG: Minas Gerais.

Discussion

Phenotypic tests for detection of the plasmid were positive when *Y. enterocolitica* O:3 strains were incubated at 37°C. This is due to the plasmid characteristic related to this temperature [8]. In addition to the virulence plasmid, 11 pathogenic *Y. enterocolitica* O:3 strains had chromosomally encoded virulence genes (Table 2). The obtained results demonstrated the correlation of biotype and serotype (O:3 biotype 4) with pathogenic potential to susceptible hosts [27].

Ten human isolated strains showed only chromosomal virulence genes (Table 2). One of the hypotheses for this is the loss of plasmid, which can be easily lost at temperatures above 30°C, depending on the culture conditions [28]. However, it is not known how the plasmid may be lost below 30°C; further research is required [8]. Nine biotype 1A strains, both from food and environmental sources, and one from an animal source (Table 2), showed the *inv* gene. The strains of this biotype have generally been regarded as avirulent. The genes present in such strains match findings in Brazil [29] and worldwide [30], demonstrating the pathogenic potential of the representatives of this biotype.

Antimicrobial susceptibility test revealed the high resistance of *Y. enterocolitica* to ampicillin (100%) and cephalotin (97%) (Table 3), which has been commonly described in the literature [31]. This resistance is probably due to the presence of chromosomal genes *blaA* and *blaB* responsible for producing two β -lactamases, A and B [31]. Also, six (10%) strains were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and seven (12%) to tetracycline, which are two antibiotics used in yersiniosis treatment [7,31]. One strain showed resistance to amikacin (AMP-CEF-AMK-SFT profile), an aminoglycoside, used in combination with other antibiotics for the treatment of extra-intestinal yersiniosis [2,7]. Such resistance has been described in strains isolated from animals in Brazil [32].

AMP-CEF-SFT was the resistance profile most commonly found in 26 strains of serotype O:3 and not serologically typed and no pattern could be established as to the serotype/biotype or origin. The strain YE42 (profile: AMP, CEF, FOX, SFT, TET) showed resistance to three different classes of antibiotics (cephalosporin, sulfonamide, and tetracycline), except for ampicillin and cephalotin (Table 3). Resistance to multiple antimicrobial agents was a rare event [33].

Low resistance to antibiotics was observed in isolated strains showing all virulence factors (Table 2).

Plasmid pYV plays no role in terms of participation in the antimicrobial resistance profile [34].

PFGGE analysis revealed nine clusters (A to I) grouping isolated strains with $\geq 85\%$ similarity (Figure 1). In these clusters, 36 pulsotypes were grouped, generating a discriminatory index of diversity of 0.957.

Cluster A comprised 21 pulsotypes (A1 to A21) with 87% similarity among isolated strains, all from bio-serotype 4/O:3 of animal and human sources. The high levels of similarity between the profiles match the results in the literature. They strongly support the hypothesis that pigs play an important role in the epidemiology of human sporadic *Y. enterocolitica* 4/O:3 infections [35].

The swine isolated strains belong to the same region and the same period of isolation, presenting a great similarity between them, featuring the epidemiological situation as a restrict niche. It is worth mentioning that A11 comprised two strains isolated from humans, one from Santa Catarina and another from Rio de Janeiro in 2008 and 2005, respectively. Based on this result, this pulsotype might circulate in Brazil, even in geographically distinct regions that are swine farming complexes. Additionally, pulsotypes A13 and A15 grouped strains isolated from human and animal sources, supporting the hypothesis.

It should be noted that swine farming products (meat, sausages, etc.) are typically marketed to various locations, whether or not geographically distant, promoting the circulation of *Y. enterocolitica* bio-serotype 4/O:3, with high phenotypic and genotypic similarity in various regions.

Based on this, two hypotheses may be proposed in order to explain the similarity of about 87% within cluster A. The first one is that these strains may be genetically related (same genetic lineage), and this difference may be due to some genetic events (point mutations) such as deletion or insertion of DNA or loss or gain of restriction sites [24]. The second hypothesis relates to the great natural similarity found between strains isolated from humans and from swine. Studies conducted in Finland and Germany showed that strains isolated from humans were almost indistinguishable from strains isolated from swine in those regions [35].

The biotype 1A strains isolated from food and the environment had greater diversity between fingerprints of their bands and were spread to the other clusters (B to I). This diversity may be related to different serotypes from this biotype; some of those strains could not be serologically typed [32,36].

Upon PFGE analysis of the strains with all virulence factors, it was observed that some of the samples were grouped in the same pulsotypes, such as A9, comprising YE14 and 15; A11, comprising strains YE 21, 23, 24, and 26; and A17, comprising the samples YE57 and 58. Based on these results, PFGE may be able to group strains bearing virulence genes. However, additional studies should be performed and further developed, provided that these samples are grouped within the same pulsotypes, rather than grouped according to their origins or their isolation source or serotype/biotype.

No direct correlation could be established between the pulsotypes of *Y. enterocolitica* and antimicrobial resistance patterns, as was observed in previous studies abroad [34].

Conclusions

Based on the results, *Y. enterocolitica* strains with bio-serotype 4/O:3, isolated from human and animal sources, showing the same genotypic profiles and bearing all virulence factors, circulate among several Brazilian states. These strains could become a potential threat to public health in Brazil as they have in Europe.

Acknowledgements

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Mollaret HH, Bercovier H, Alonso JM (1979) Summary of the data received at the WHO reference Center for *Yersinia enterocolitica*. *Contr Microbiol Immunol* 5: 174-184.
- Bottone EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical Microbiol Rev* 10: 257-276.
- Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R (2011) *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001 – 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1543-1550.
- Ortiz Martínez P, Mylona S, Drake I, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Corry JE (2010) Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. *Int J Food Microbiol* 139: 64-69.
- Falcão JP, Falcão DP (2006) Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. *J Basic Appl Pharma Sciences* 27: 9-19.
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 315-329.
- Fàbrega A, Vila J (2012) *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 30: 24-32.
- Zheng H, Sun Y, Mao Z, Jiang B (2008) Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 368-374.
- Wren BW, Tabaqchali S (1990) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet* 3: 693.
- Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC (2005) Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz* 64: 155-161.
- Wauters G (1981) Antigens of *Yersinia enterocolitica*. In Bottone EJ, editor. *Yersinia enterocolitica*. Boca Raton: CRC Press. 41-53.
- Mollaret HH, Bercovier H, Alonso JM (1990) *Yersinia*. In: Le Minor L, Vérom M, editors. *Bactériologie Médicale*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. 298-315.
- Winblad S (1968) Studies on O antigen factors of "*Yersinia enterocolitica*". *Internat Symp on Pseudotuberculosis*, Paris, 1967. *Symp Series Immunobiol Standard* 9: 361-368.
- Asensi MD, Hofer E (1985) Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. I - Bacteriologia. São Paulo. *Rev Microbiol* 16: 260-268.
- Skurnik M, Bölin I, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 158: 1033-1036.
- Bhaduri S, Conway LK, Lachica RV (1987) Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 25: 1039-1042.
- Riley G, Toma S (1989) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. *J Clin Microbiol* 27: 213-214.
- Kandolo K, Wauters G (1985) Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J Clin Microbiol* 21: 980-982.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Approved standard, CLSI document M100-S2131. CLSI: Wayne, PA, USA.

20. Rasmussen HN, Rasmussen OF, Andersen JK, Olsen JE (1994) Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. *Mol Cell Prob* 8: 99-108.
21. Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh KI, Arakawa E, Watanabe H (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J Clin Microbiol* 30: 2484-2486.
22. Ibrahim A, Liesack W, Griffiths MW, Robins-Browne RM (1997) 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* 35: 1636-1638.
23. Centers for Disease Control (2006) One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Yersinia pestis* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). PulseNet USA. Atlanta: CDC. Available: http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/yersinia_Apr2006.pdf. Accessed 22 August 2011.
24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
25. Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD (2007) Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 45: 3707-3712.
26. Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465-2466.
27. Paixão R, de Gobbi DD, Raimundo DC, Hofer E, Matte MH, Moreno AM (2012) 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* 954: 117-122.
28. Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bögli-Stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T (2003) PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl Environ Microbiol* 69: 1810-1816.
29. Paixão R, Moreno LZ, Gobbi DDS, Raimundo DC, Hofer E, Matté MH, Ferreira TSP, Gomes VTM, Costa BLP, Moreno AM (2013) Characterization of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains Isolated from Swine Slaughterhouses and Markets. *The Scientific World Journal*. Article ID 769097.
30. Kraushaar B, Dieckmann R, Wittwer M, Knabner D, Konietzny A, Mäde D, Strauch E (2011) Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an ail gene. *J Appl Microbiol* 111: 997-1005.
31. Bonke R, Wacheck S, Stuber E, Meyer C, Märklbauer E, Fredriksson-Ahomaa M (2011) Antimicrobial Susceptibility and Distribution of b-Lactamase A (*blaA*) and b-Lactamase B (*blaB*) Genes in Enteropathogenic *Yersinia* Species. *Microbial Drug Resist* 17: 575-581.
32. Falcão JP, Falcão DP, Silva AP, Malaspina AC, Brocchi M (2006) 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* 55: 1539-1548.
33. Baumgartner A, Küffer M, Suter D, Jemmi T, Rohner P (2007) Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 115: 110-114.
34. Fredriksson-Ahomaa M, Meyer C, Bonke R, Stuber E, Wacheck S (2010) Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs. *Lett Appl Microbiol* 50: 412-418.
35. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H (2006) Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. *J Med Microbiol* 55: 747-749.
36. Souza RA, Pitondo-Silva A, Falcão DP, Falcão JP (2010) Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and identifying species among *Yersinia* isolates. *J Microbiol Meth* 82: 141-150.

Corresponding author

Leonardo Alves Rusak, M.S.
Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – LAPIH
Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Setor Listeria - LABZOO
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima
3º andar/ 315, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil
Phone: + 55- (21) 2562-1612
Email: rusak@ioc.fiocruz.br

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

Next-generation sequencing virulome analysis of a *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* bioserotype 4/O:3 ST18 isolated from human blood in Brazil

Leonardo Alves Rusak^{a,*}, Ricardo Magrani Junqueira^b, Ernesto Hofer^c,
Deise Christina Vallim^c, Marise Dutra Asensi^a

^a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Setor Listeria, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2016

Accepted 27 April 2017

Available online xxx

Keywords:

Yersinia enterocolitica

Virulence

Brazil

Next-generation sequencing

ABSTRACT

Yersinia enterocolitica is a widespread Gram-negative bacterium that causes gastrointestinal disease and other clinical manifestations in humans. Potentially pathogenic *Y. enterocolitica* has been isolated in Brazil, from human, environmental, food, and animal sources. Herein we report a genome sequence of *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* strain YE 19, serotype O:3, biotype 4, sequence type 18, with virulence determinants isolated from human blood in Rio de Janeiro in 2005. The results corroborate other findings that this strain harbors a set of virulence determinants that could play a role in host pathoadaptation and may also justify the successful dissemination of bioserotype 4/O:3 in Brazil. The presence of strains harboring all of these virulence genes in Brazil is a potential threat to young children and immunocompromised individuals, for whom yersiniosis are a significant source of morbidity and mortality. The results of a genomic data analysis will help understand the virulence of Brazilian strains and provide data for *Y. enterocolitica* studies worldwide.

© 2017 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Yersinia enterocolitica is an enteric pathogen with a wide range of clinical and immunological manifestations, which depend on age and physical condition of the patient. Responsible for intestinal diseases, the most frequent occurrence in infants and children, including enterocolitis with an inflammatory

diarrhea; however, in older children and young adults the symptoms include acute terminal ileitis and mesenteric lymphadenitis (mimicking appendicitis). On the other hand, in some cases, extra-intestinal manifestations have also been reported, including urinary tract and respiratory tract infection (empyema), osteoarticular infection (reactive arthritis), erythema nodosum, infected mycotic aneurysm, axillary abscesses, and endocarditis.^{1,2} *Y. enterocolitica* is the major

* Corresponding author.

E-mail address: rusak@ioc.fiocruz.br (L.A. Rusak).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.04.005>

1413-8670/© 2017 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

causative agent of yersiniosis worldwide and is typically transmitted via the fecal-oral route to humans and animals.³ *Y. enterocolitica* can be classified by biochemical characteristics and serotyped into six biotypes (BT) (1A, 1B, 2, 3, 4, and 5).¹ Strains that are non-pathogenic to humans and animals belong to BT1A, whereas highly pathogenic strains belong to BT1B; BT2-5 are low to moderate-pathogenic strains. The serotype O:3 biotype 4 comprises about 80-90% of human isolates in Germany and Europe, with rising global relevance.⁴

Little attention has been given to this microorganism in Brazil, where it is still poorly studied. Although Brazil has no official data about the incidence of this pathogen, sporadic cases have been published and some studies demonstrate the pathogenic potential of strains isolated from many sources, including humans, the environment, food, and animals. The bioserotype 4/O:3 is the main bioserotype isolated from human clinical cases.^{5,6}

The aim of this brief communication was to analyze the virulence profile and announces the genome sequence of *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica*, strain YE 19, serovar O:3, biotype 4 isolated in 2005 from blood of a hospitalized patient in Rio de Janeiro. It was deposited in the Collection of *Listeria* (CLIST) located at the Bacterial Zoonoses Laboratory (LABZOO/Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation) under the accession number CLIST 4117. Sequence type 18 (ST18) was determined by multilocus sequence typing (MLST) and by use of the *Yersinia* MLST website. The ST18 comprises the main *Y. enterocolitica* serotype O:3 sequence type based on MLST database.

A next-generation sequencing (NGS) technique was used to analyze the virulome of YE 19 strain. Genomic DNA was extracted using DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) and the DNA library was prepared with Nextera XT (Illumina, San Diego, CA). Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina Inc., USA) generating 100bp paired-end reads. The sequence data were processed using Trimmomatic (v0.35) and paired-end reads were merged using FLASH (v1.2.11).⁷ De novo assembly was performed using SPAdes (v3.7.1).⁸ Ragout (v1.2)⁹ was utilized for reference assisted scaffolding of contigs against *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* Y11 genome (NC.017564.1). Sealer (v1.9.0)¹⁰ was used for gap filling and Pilon (v1.16)¹¹ performed polishing. The resulting assembly was evaluated using REAPR (v1.0.18).¹² The NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013) annotated the final genome model comprising 19 scaffolds with a total length of 4,550,059bp and 47% GC. The summary of genomic statistics is reported in Table 1. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession LYBL00000000. The version described in this paper is version LYBL01000000.

The presence of virulence factors was investigated using SRST2 program (v0.1.7) against the Virulence Factor Database (VFDB). The details of all virulence genes found are reported in supplementary file 1. Fig. 1 is built to show where each virulence gene is located on YE 19 genome.

A total of 103 virulence genes have been identified from the VFDB. These virulence genes are related to motility, the secretion system, toxins, the O antigen (lipopolysaccharide - LPS), hemin uptake, invasion, and adherence.

Table 1 – Genome features.

Property	YE 19
Total length (bp)	4550059
Scaffolds	19
Contigs	135
N50	620817
GC (%)	47
Genes (total)	4138
CDS (total)	4034
Genes (coding)	3857
CDS (coding)	3857
Genes (RNA)	104
rRNAs	8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
tRNAs	73
ncRNAs	9
Pseudo Genes (total)	177

We detected virulence determinants of motility controlled by *flhE*, *fliN*, *fliL*, *flgA*, *fliD*, *fliC*, *fliP*, *flgD*, *flhA*, *fliS*, *flhB*, *flgK*, *fliF*, *flgB*, *flgJ*, *flgC*, *flgL*, *flgN*, *flgM*, *flhC*, *fliE*, *fliO*, *fliH*, *flgE*, *fliB*, *fliA*, *fliK*, *fliI*, *flgF*, *flgI*, *fliG*, *fliR*, *flgH*, *flhD*, *flgG*, *fliT*, *fliM*, *fliZ*, and *fliQ*. These genes act in other processes, such as cellular invasion, biofilm formation, and the secretion system (the type III secretion/flagella biosynthesis apparatus).^{13,14} We found the *cheA*, *cheB*, *cheD*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ* genes, which act in the chemotaxis mechanism, by which bacteria efficiently and rapidly respond to changes in the chemical composition of their environment. This behavior modulates the direction of flagellar rotation.¹⁵ Finally, we found the *motA* and *motB* genes, which encode flagellar motor protein MotA and MotB, respectively, and build the flagellar-motor supramolecular complex stator.¹⁵

The *yst1L*, *yst1J*, *yst1K*, *yst1F*, *yst1E*, *yst1G*, *yst1C* and *YE105_C0912* genes encode proteins that build the type II secretion system (T2SS). All *Yersinia* species, non-pathogenic as well as pathogenic, possess at least one of the two T2SS. The one T2SS that has so far been studied is termed Yts1, which is involved in dissemination and colonization of deeper tissues like liver and spleen in mouse infection experiments. Furthermore, the *Yts10* gene encodes the Yts10 protein, which is a putative prepilin-like peptidase.¹⁶

YE105_C0309, *YE105_C0310*, *YE105_C0312*, *YE105_C0313*, *YE105_C0314*, *YE105_C0323*, *YE105_C0324*, *YE105_C0325*, *YE105_C0326*, *YE105_C0327*, *YE105_C0328*, *YE105_C0332*, *YE105_C0333*, *YE105_C0334*, *YE105_C0335*, *YE105_C0336*, *YE105_C0338*, *YE105_C0339*, *YE105_C0340*, *YE105_C0341* are a set of genes that received the name of the strain from where they were recognized for the first time. These genes encode proteins that build the Ysc type III secretion system (pYV-encoded T3SS/TTSS). The T3SS is the mechanism by which pathogenic *Yersinia* injects proteins directly into the eukaryotic cell cytosol.³ *Y. enterocolitica* has three different type III secretion systems, Ysc (pYV-encoded), Ysa (exclusive to biovar 1B), and the flagellar.^{2,3,13} Surprisingly, the genes found on YE 19 genome were related to the proteins (YscC, R, and U) that built the Ysc T3SS¹⁷ (Supplementary file 1). These findings reinforce the hypothesis that this strain already had the pYV and, somehow, these genes could be integrated into the chromosome. Meanwhile, further studies are needed to confirm this possibility.

threat to young children and immunocompromised individuals, for whom yersiniosis can represent a significant source of morbidity and mortality.³ We hope this genomic data analysis helps understanding the virulence issue of Brazilian strains and contributes for *Y. enterocolitica* studies worldwide.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.04.005>.

REFERENCES

- Sabina Y, Rahman A, Ray RC, Montet D. *Yersinia enterocolitica*: mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. *J Pathog*. 2011;2011:1–10.
- Fàbrega A, Vila J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:24–32.
- Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog*. 2011;2011:1–16 [Internet]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335670&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>
- Batzilla J, Antonenka U, Höper D, Heesemann J, Rakin A. *Yersinia enterocolitica* *paleartica* serobiotype O:3/4 – a successful group of emerging zoonotic pathogens. *BMC Genomics*. 2011;12:348 [Internet]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/348>
- Falcão JP, Falcão DP. Importance of *Yersinia enterocolitica* in medical microbiology. *Rev Cienc Farm Basica Apl*. 2006;27:9–19 [in Portuguese].
- Rusak LA, Moura Falavina Dos Reis C, Barbosa AV, et al. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8:1533–40.
- Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27:2957–63.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19:455–77.
- Kolmogorov M, Raney B, Paten B, Pham S. Ragout – a reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. *Bioinformatics*. 2014;30:302–9.
- Paulino D, Warren RL, Vandervalk BP, Raymond A, Jackman SD, Birol I. Sealer: a scalable gap-closing application for finishing draft genomes. *BMC Bioinform*. 2015;16:230 [Internet]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/230>
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLOS ONE*. 2014;9.
- Hunt M, Kikuchi T, Sanders M, Newbold C, Berriman M, Otto TD. REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome Biol*. 2013;14:R47 [Internet]. Available from: <http://genomebiology.com/2013/14/5/R47>
- Kim TJ, Young BM, Young GM. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:5466–74.
- Kapatral V, Campbell JW, Minnich SA, Thomson NR, Matsumura P, Prüß BM. Gene arrays analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiology*. 2004;150:2289–300.
- Bren A, Eisenbach M. How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein–protein interactions in sensory signal propagation. *J Bacteriol*. 2000;182:6865–73 [minireview].
- von Tils D, Blädel I, Schmidt MA, Heussipp G. Type II secretion in *Yersinia* – a secretion system for pathogenicity and environmental fitness. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:160 [Internet]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3521999&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>
- Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc–Yop “Type III” weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:742–54 [Internet]. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm932>
- Stojiljkovic I, Hantke K. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J*. 1992;11:4359–67.
- Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:169 [Internet]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079665&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>
- Fuchs TM, Brandt K, Starke M, Rattei T. Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics*. 2011;12:168 [Internet]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079665&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>

WEB REFERENCES

Yersinia MLST website (available from: <http://pubmlst.org/yersinia/>) developed by Keith Jolley and sited at the University of Oxford (Jolley & Maiden 2010, *BMC Bioinformatics*, 11:595) [accessed in 08.29.16].
The Virulence Factor database (VFDB) (available from: <http://www.mgc.ac.cn/VF/>) [accessed in 08.29.16].