

## MARCADORES DE PATOGENICIDADE EM *Yersinia enterocolitica* O:3 ISOLADAS DE SUÍNOS DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

Tereza C. A. Leal<sup>2,3</sup>, Nilma C. Leal<sup>2</sup> e Alzira M. P. Almeida<sup>2,4</sup>

**ABSTRACT.**- Leal T.C.A., Leal N.C. & Almeida A.M.P. 1997. [Genetic markers of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from healthy pigs from Rio de Janeiro.] Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17(1):19-24. Depto Microbiologia, CPqAM-FIOCRUZ-MS, Cx. Postal 7472, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brazil.

Sixteen *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 strains, isolated from pigs from Rio de Janeiro, have been analyzed for genetic and phenotypic markers of pathogenicity. It was observed that only 6 strains harbored the pYV (+70 kb) plasmid and one strain harbored a small cryptic plasmid of about 8.6 kb. Accordingly only strains harboring pYV were calcium dependent in the MOX medium at 37°C. Twelve strains showed pesticin sensitivity and the esculin reaction was negative in 13 strains. PCR analysis of pathogenicity genes using specific primers showed the presence of the *ail* gene in 14 strains, the *irp2* gene in one and the *psaA* in none. Most of the strains were resistant to ampicillin and carbenicillin, although they were susceptible to sulfazotrin and cefoxitin. For chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, gentamicin and nalidixic acid the results varied among the strains.

**INDEX TERMS:** *Yersinia enterocolitica*, swine, genetic markers, pathogenicity.

**SINOPSE.**- Foi realizada a caracterização genotípica e fenotípica de fatores de patogenicidade em 16 amostras de *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos saudáveis do Rio de Janeiro. Foi observado que apenas 6 cepas possuíam o plasmídeo de virulência, pYV (+70 kb) e apresentavam dependência ao cálcio no meio MOX a 37°C. Um plasmídeo críptico de cerca de 8,6 kb foi encontrado em uma cepa. Doze cepas revelaram sensibilidade à pesticina enquanto que apenas três se revelaram capazes de hidrolisar a esculina. Através de PCR com "primers" específicos, foi constatada a presença dos genes *ail* em 14 cepas, *irp2*, em 1 cepa e a ausência de *psaA* em todas as cepas analisadas. Quanto aos quimioterápicos, a quase totalidade das cepas mostrou-se ao mes-

mo tempo resistente à ampicilina e carbenicilina e sensível ao sulfazotrin e à cefoxitina. As respostas foram variadas frente ao cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, gentamicina e ácido nalidíxico.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Yersinia enterocolitica*, suínos, marcadores genéticos, patogenicidade.

### INTRODUÇÃO

*Yersinia enterocolitica*, bactéria Gram-negativa, da família Enterobacteriaceae, é responsável por diferentes quadros clínicos no homem, que variam de diarreias brandas a adenite mesentérica ou pseudo-apendicite, além de manifestações extra-intestinais (cutâneas, oculares). A espécie é largamente disseminada no ambiente e em diversos animais: répteis, anfíbios, aves e mamíferos. Os suínos são considerados reservatórios, porque os mesmos sorotipos humanos são encontrados na orofaringe e nas fezes desses animais (Bottone 1977). No Brasil, *Y. enterocolitica* tem sido encontrada no homem, e em animais (cães e suínos), enfermos ou saudáveis, na água e vários tipos de alimentos (leite, carne e derivados, vegetais) principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 12 de novembro de 1996.

Trabalho financiado pela FACEPE (Proc. APQ. 0237-2.12/94).

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - MS, Campus da UFPE, Caixa Postal 7472, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420.

<sup>3</sup> Bolsista da CAPES (Mestrado).

<sup>4</sup> Bolsista do CNPq (Proc. 52.0572-94.7).

Janeiro e Rio Grande do Sul (Ceccarelli et al. 1990, Nunes & Ricciardi 1986, Tassinari et al. 1994, Warnken et al. 1987). As cepas isoladas têm sido estudadas quanto à produção da enterotoxina termoestável (Yst), capacidade invasora “in vivo” através do teste de Sé-reny e “in vitro” em cultura de células Hela. Também têm sido estudadas algumas propriedades relacionadas, ao plasmídeo de virulência pYV (Castro et al. 1983, Mendonça et al. 1995, Nunes et al. 1984, Toledo et al. 1982). Entretanto a presença dos fatores genéticos de patogenicidade ainda não haviam sido estudados nas cepas isoladas. Diante disso e considerando que os resultados das provas de fenotipagem dependem da estabilidade dos genes em resposta às variações ambientais (Straley & Perry 1995) realizamos a caracterização fenotípica e genotípica de alguns fatores de patogenicidade em 16 cepas de *Y. enterocolitica* O:3, isoladas de suínos sadios do Estado do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bactérias e condições de cultivo

Foram analisadas 16 cepas de *Yersinia enterocolitica* do sorotipo O:3, isoladas de suínos sadios (língua, amígdalas, linfonodo mesentérico, “swab” retal, conteúdo cecal). Adicionalmente foram incluídas quatro cepas isoladas de fezes humanas dos sorotipos O:4; O:5; O:6 e O:13 (Quadro 1). Todas as cepas de *Y. enterocolitica* foram obtidas da coleção de culturas do Departamento de Bacteriologia do IOC/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ). As cepas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R861, *Y. pestis* EV76, *Y. pestis* A1122 e *Y. pestis* P. PB 881, foram utilizadas como controle conforme especificado em cada técnica descrita a seguir. Para os trabalhos, as cepas foram plaqueadas em base de agar sangue (BAB) e crescidas em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) durante 18 a 24h a 28°C.

### Análise do perfil plasmidial

O DNA plasmidial das 20 cepas foi extraído pela técnica de Birnboim & Doly (1979) modificada na Escola Paulista de Medicina (São Paulo, SP), submetido à eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio (10 mg/ml) e observado em transiluminador de luz ultravioleta.

### Extração do DNA total ou genômico

O DNA das 20 cepas de *Y. enterocolitica* foi extraído segundo protocolo descrito por Maniatis et al (1982). O DNA obtido foi quantificado por comparação, em gel de agarose a 1%, com quantidade conhecida de DNA do fago I clivado pela enzima *Hind* III.

### PCR com “primers” específicos

A presença dos genes *ail*, *irp2* e *psaA* foi investigada pela técnica de PCR com “primers” dirigidos a sequências publicadas desses genes.

Para amplificação de *ail* foram usados os “primers”:

5'- ATGAAAAGACATTACTAGCT -3' e

5'- GAATCGATACCCTGCACCAAG -3' desenhados a partir da sequência publicada por Miller et al. (1990).

Para amplificação do gene *irp2* foram adotados os primers:

5'-AAGGATTCGCTGTACCGGAC-3' e

5'-TCGTCGGGCAGCTTTCTTC T-3' desenhados a partir da sequência publicada por Guilvout et al. (1993).

Para o gene estrutural do antígeno pH6, foram usados os “primers”:

5'-CATGAAAATGAAATGTTTTCG-3' e

5'-AATACATACTCTCAACACGC-3' construídos com base na sequência do gene *psaA* publicada por Lindler & Tall (1993).

### Amplificação

Cada reação foi preparada em um volume total de 25 ml por tubo. Cada mistura compreendia: 20 ng do DNA genômico, 1U da enzima *Taq* polimerase (CENBIOT/RS), 0,16 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada “primer”, 50 mM de KCl e 10 mM de tris-HCl. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Perkin Elmer), programado para 25 ciclos, iniciando por uma etapa de desnaturação de 1 min a 94°C, seguida de uma etapa de anelamento de 2 min a 50°C, uma de alongamento de 3 min a 72°C, e terminando por uma etapa de alongamento final de 7 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-borato e voltagem constante de 100V, seguido de coloração com brometo de etídio e visualização em transiluminador de UV. Em cada partida de amplificação, foi incluído um controle negativo, que consistia de um tubo contendo todos os componentes da mistura de reação ao qual não se adicionava DNA e um controle positivo, com o DNA de uma cepa de referência.

### Dependência ao cálcio

Cada cepa foi semeada em duas placas do meio agar oxalato de magnésio (MOX) e incubadas respectivamente a 28°C e 37°C para comparação do crescimento nas duas temperaturas. O crescimento das culturas dependentes do cálcio é inibido a 37°C, enquanto que as culturas independentes do cálcio se desenvolvem de maneira semelhante nas duas temperaturas (Gemski et al. 1980).

### Receptor para pesticina

A sensibilidade à pesticina foi averiguada pela técnica de difusão em dupla camada de agar (Beesley & Surgalla 1970). A cepa *Yersinia pestis* EV76 foi usada como produtora de pesticina. A sensibilidade à bacteriocina é evidenciada pelo aparecimento de um halo de inibição em torno das colônias da cepa produtora.

### Hidrólise da esclulina

As cepas foram plaqueadas no meio agar desoxicolato com 0,2% de esclulina, conforme descrito por Hofer et al. (1979). As cepas esclulina positivas formam colônias negras no meio de cultura e as esclulina negativas formam colônias claras.

### Antibiograma

A sensibilidade aos quimioterápicos foi avaliada pelo método de difusão de discos (Bauer et al. 1966) utilizando-se o agar Mueller-Hilton e os seguintes agentes antibacterianos nas concentrações especificadas: cloranfenicol (30 mcg), ampicilina (10 mcg), sulfazotrin (25 mcg), tetraciclina (30 mcg), kanamicina (30mcg), cefoxitina (30 mcg), gentamicina (100 mcg), carbenicilina (100 mcg) e ácido nalidíxico (30 mcg). Os discos foram obtidos comercialmente (Biolab, CECON). A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mecanismos de patogenicidade de *Yersinia enterocolitica* são complexos e envolvem numerosos fatores. Atualmente vários marcadores de patogenicidade já foram identificados no genoma dessa bactéria. A presença de um plasmídeo de cerca de 70 kilobases, denominado pYV, é essencial à virulência das cepas e as culturas que não têm esse plasmídeo são avirulentas. O plasmídeo pYV codifica várias proteínas que conferem à *Y. enterocolitica* capacidade de resistir a resposta

imune primária do hospedeiro (Straley & Perry 1995). A presença de pYV torna as bactérias dependentes de uma concentração mínima de cálcio de 2,5 mM para crescimento a 37°C (Gemski et al. 1980). A análise do perfil plasmidial das 16 amostras de *Y. enterocolitica* do sorotipo O:3 isoladas de suínos sadios do Rio de Janeiro e das 4 cepas humanas dos sorotipos O:4, O:5, O:6 e O:13 revelou que apenas 6 entre as 16 cepas suínas possuíam o plasmídio pYV (Fig. 1A-E) e que nenhuma cepa humana possuía este plasmídio. A ausência do pYV na maioria das cepas poderia ser atribuída à cura desse plasmídio "in vitro" pelas manipulações no laboratório depois do isolamento. Um plasmídio críptico de cerca de 8,6 kilobases foi encontrado em uma cepa de suíno (Fig. 1D). Todas as cepas analisadas portadoras do pYV, apresentaram dependência ao cálcio no meio MOX a 37°C. Tanto as cepas suínas quanto as humanas que não apresentavam o plasmídio, revelaram-se independentes do cálcio, confirmando a ausência do plasmídio. A cepa portadora do pequeno plasmídio também se revelou independente do cálcio (Quadro 1).

Além da presença do pYV, as cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas, também possuem fatores de patogenicidade codificados por genes cromossômicos. Miller & Falkow (1988) demonstraram que a capacidade da *Y. enterocolitica* de aderir e invadir células epiteliais está relacionada à presença de um segmento de DNA cromossômico que foi denominado *ail*. Foi observado que todas as cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas para o homem possuem sequências de DNA homólogas à *ail*, enquanto que as cepas de origem ambiental, avirulentas, não possuem esta sequência (Miller et al. 1989). Através da técnica de PCR foi constatada a amplificação de um segmento correspondente à *ail*, a partir do DNA de 14 cepas suínas. Entre as cepas humanas foi observada amplificação de *ail* a partir do DNA das cepas dos sorotipos O:6 e O:13 enquanto que com o DNA das cepas dos sorotipos O:4 e O:5 não houve

amplificação (Quadro 1). A Figura 2A mostra os produtos da amplificação por PCR do gene *ail* em 8 cepas suínas e 1 humana.

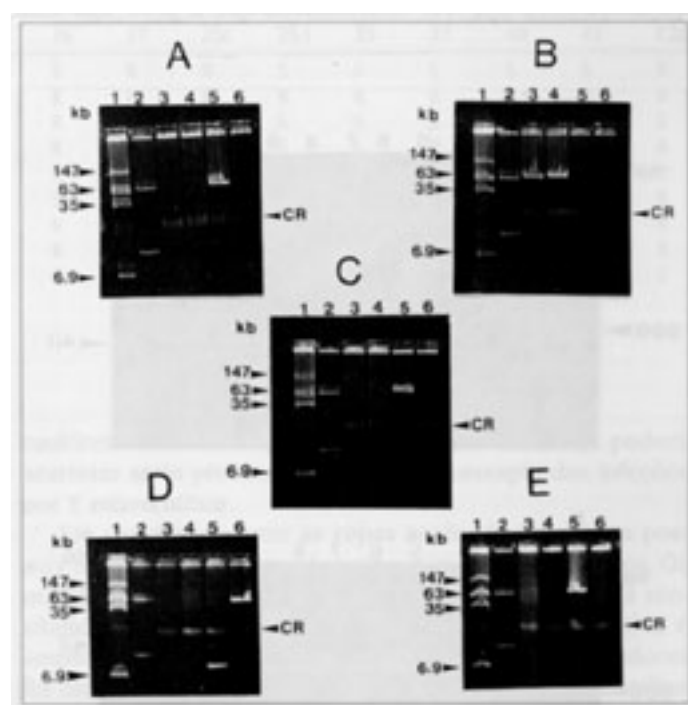


Fig. 1. Perfil plasmidial das 20 cepas (suínas e humanas) de *Yersinia enterocolitica*, em gel de agarose 0,6%. Linhas, 1: *Escherichia coli* R861, 2: *Y. pestis* EV 76. (A) Linhas, 3: Ye 6, 4: Ye 10, 5: Ye 25 c e 6: Ye 14. (B) Linhas, 3: Ye 25 l, 4: Ye 35, 5: Ye 16 e 6: Ye 17. (C) Linhas, 3: Ye f 28, 4: Ye 2, 5: Ye 37 e 6: Ye 184 p. (D) Linhas, 3: Ye 1, 4: Ye 43 p, 5: Ye 5 a e 6: Ye 40. (E) Linhas, 3: Ye 102 p, 4: Ye 5, 5: Ye 41, 6: Ye 124 p.

Quadro 1. Características genotípicas e fenotípicas das amostras de *Yersinia enterocolitica*

Cepas	Sorotipo	Origem	Plasmídio (kb)	Dependência ao cálcio	Receptor para pesticina	Hidrólise da esculina	PCR		
							<i>ail</i>	<i>irp2</i>	<i>psaA</i>
6	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
10	O:3	Suíno	-	-	-	-	+	-	-
14	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
16	O:3	Suíno	-	-	-	-	+	-	-
17	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
25 c	O:3	Suíno	70	+	+	-	+	-	-
25 l	O:3	Suíno	70	+	+	-	-	-	-
35	O:3	Suíno	70	+	+	-	+	-	-
37	O:3	Suíno	70	+	-	-	+	-	-
40	O:3	Suíno	70	+	+	-	+	-	-
41	O:3	Suíno	70	+	+	-	-	+	-
1	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
2	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
5	O:3	Suíno	-	-	-	-	+	-	-
5 a	O:3	Suíno	8,6	-	+	+	+	-	-
f 28	O:3	Suíno	-	-	+	-	+	-	-
43 p	O:6	Humano	-	-	+	-	+	-	-
102 p	O:5	Humano	-	-	+	+	-	-	-
124 p	O:4	Humano	-	-	+	-	-	-	-
184 p	O:13	Humano	-	-	-	+	+	-	-

Carniel et al. (1989) observaram que na ausência de ferro, as yersínias patogênicas sintetizam proteínas de alto peso molecular, uma das quais, HMWP2 é codificada pelo gene cromossômico *irp2*. Foi demonstrado que o gene *irp2* está

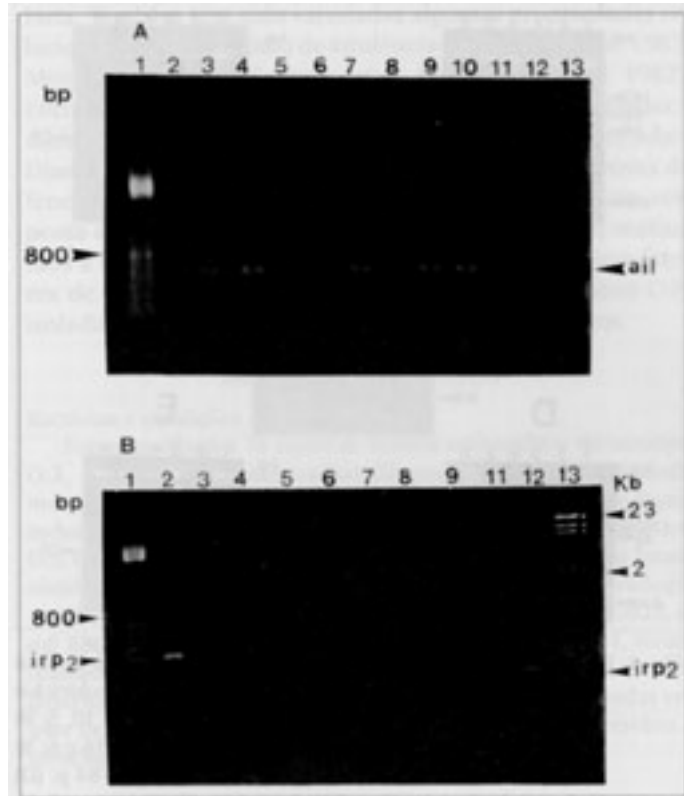


Fig. 2. (A) Produtos de PCR do gene *ail* em cepas suínas de *Y. enterocolitica*. Linhas, 2: Ye 6, 3: Ye 35, 4: Ye 2, 5: Ye 10, 6: Ye 5, 7: Ye 37, 9: Ye 40, 11: Ye f 28, 12: Ye 41. Cepas humanas: linhas, 8: Ye 102 p, 10: Ye 184 p. Linhas, 1: 100-bp DNA ladder e 13: *Y. pestis* P. PB 881. (B) Produtos de PCR do gene *irp2* em cepas suínas de *Y. enterocolitica*. Linhas, 2: Ye 41, 3: Ye 2, 5: Ye 1, 8: Ye 5, 9: Ye 5 a. Cepas humanas: linhas, 4: Ye 184 p, 6: Ye 43 p, 7: Ye 102 p, 10: Ye 124 p. Linhas, 1: 100-bp DNA ladder, 11: controle negativo, 12: *Y. pestis* P. PB 881 e 13: I *Hind* III.

presente apenas nas cepas patogênicas e não se encontra nas cepas não patogênicas (Almeida et al. 1993). Diante desses resultados o gene *irp2* é considerado um marcador de alta patogenicidade (Carniel et al. 1992). Entre as cepas de *Y. enterocolitica* analisadas a amplificação do segmento de DNA correspondente ao gene *irp2* foi observada apenas na cepa Ye 41 (isolada de suíno). Vale salientar que o tamanho do fragmento amplificado nessa cepa é diferente do fragmento amplificado na cepa de *Yersinia pestis* P. PB 881 utilizada como controle (Fig. 2B). Este resultado reflete o polimorfismo do segmento de DNA cromossômico contendo o gene *irp2* nas três espécies de yersínia patogênicas. Através de hibridização com uma sonda do gene *irp2*, o fragmento de DNA reconhecido no cromossomo de *Y. pestis* é similar ao de *Yersinia pseudotuberculosis* porém é diferente do que é reconhecido no cromossomo de *Y. enterocolitica* (Almeida et al. 1993). Não houve amplificação de *irp2* nas outras 15 cepas de suínos nem nas cepas de origem humana (Quadro 1).

A capacidade de sintetizar o antígeno pH6 codificado pelo gene cromossômico *psaA* é considerada necessária à virulência da *Y. pestis*. Este antígeno é também produzido por *Y. pseudotuberculosis* que é enteropatogênica (Lindler & Tall 1993). Entretanto, a presença do gene no cromossomo de *Y. enterocolitica* e a função desse antígeno na patogenicidade dessa bactéria ainda não estão demonstrados. A existência do gene estrutural do antígeno pH6 (*psaA*) foi investigada pela técnica de PCR, com "primers" específicos desenhados com base na sequência publicada do gene *psaA* (Lindler & Tall 1993). Em nenhuma das cepas humanas ou suínas analisadas foi observada amplificação sugerindo a ausência desse gene, no genoma de *Y. enterocolitica* (Quadro 1). A ausência do gene *psaA* não foi surpreendente porque sua presença em *Y. enterocolitica* jamais havia sido relatada. É provável que este gene seja realmente específico das outras duas yersínias patogênicas *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* e não exista em *Y. enterocolitica*.

Foi demonstrado que as cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas são capazes de produzir um sideróforo, a yersiniabactina (Heeseman et al. 1993). O receptor para a yersiniabactina (FyuA) é também receptor para a pesticina (Rakin et al. 1994).

Quadro 2. Efeito dos agentes antimicrobianos em cepas suínas e humanas de *Yersinia enterocolitica*

Antibióticos	Sorotipos Nº de cepas	O:3 16		O:4 1		O:5 1		O:6 1		O:13 1	
		R <sup>a</sup>	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Cloranfenicol		7	9	0	1	0	1	0	1	1	0
Ampicilina		15	1	1	0	1	0	1	0	1	0
Sulfazotrim		2	14	0	1	0	1	0	1	1	0
Tetracilina		7	9	0	1	0	1	0	1	1	0
Kanamicina		9	7	0	1	0	1	0	1	1	0
Cefoxitina		2	14	1	0	1	0	1	0	1	0
Carbenicilina		15	1	1	0	1	0	1	0	1	0
Gentamicina		7	9	1	0	1	0	1	0	0	1
Ácido Nalidíxico		11	5	0	1	0	1	0	1	1	0

<sup>a</sup>R = resistente, S = sensível.

Quadro 3. Efeito dos agentes antimicrobianos em amostras de *Y. enterocolitica* do sorotipo O:3, isoladas de suínos sadios do Rio de Janeiro

Antibióticos	Identificação das cepas															
	1	2	5	5a	6	10	14	16	17	25c	25 l	35	37	40	41	f 28
Cloranfenicol	R <sup>a</sup>	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
Ampicilina	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sulfazotrin	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R
Kanamicina	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Carbenicilina	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R
Ácido nalidixico	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S

<sup>a</sup> R = resistente, S = sensível.

A pesticina é uma bacteriocina produzida por *Y. pestis*, agente causador da peste (Hertman & Ben-Gurion 1958). A síntese desta bacteriocina é codificada pelo gene *pst* localizado em um pequeno plasmídio (pPst) de cerca de 9,5 kilobases, específico de *Y. pestis* (Sodeinde & Goguen 1988). A sensibilidade à pesticina pode ser considerada um marcador de patogenicidade porque a perda do segmento de DNA cromossômico que codifica a proteína FyuA é acompanhada pela diminuição da virulência das cepas (Heeseman et al. 1993). Doze cepas suínas e três cepas humanas (O:4, O:5 e O:6) revelaram sensibilidade à pesticina podendo ser consideradas potencialmente patogênicas, enquanto que a cepa humana, do sorotipo O:13, revelou-se resistente à essa bacteriocina (Quadro 1).

Além dessas e outras características, a hidrólise da esculina é um critério importante na diferenciação fenotípica entre cepas patogênicas (esculina negativa) e não patogênicas (esculina positiva) (Bottone 1977). Através das análises realizadas no presente trabalho a maioria das cepas suínas revelou-se esculina negativa sendo consideradas potencialmente patogênicas e apenas uma era fermentadora de esculina e provavelmente não é patogênica. Entre as cepas humanas, duas foram esculina positiva e duas esculina negativa (Quadro 1).

Nas provas de sensibilidade aos quimioterápicos, a quase totalidade das cepas do sorotipo O:3 isoladas de suínos, revelou-se ao mesmo tempo resistente à ampicilina e carbenicilina e sensíveis ao sulfazotrin e cefoxitina e foi observado que as respostas foram variadas frente ao cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, gentamicina e ácido nalidíxo (Quadros 2 e 3). Quanto às cepas humanas estudadas, as amostras dos sorotipos O:4, O:5 e O:6, mostraram perfis de sensibilidade idênticos, porém, diferente do que foi observado com a outra cepa humana (O:13) que mostrou resistência a quase todos os antibióticos testados, com exceção da gentamicina. Vale salientar que os perfis de sensibilidade aos quimio-terápicos das cepas suínas foram diferentes do das cepas humanas exceto quanto à ampicilina e carbenicilina (todas resistentes) e sulfazotrim e cefoxitina (todas sensíveis) (Quadros 2 e 3). A disseminação de cepas dotadas de

multiresistência aos quimioterápicos como a 184p, poderá acarretar sério problema para a antibioterapia das infecções por *Y. enterocolitica*.

Em conclusão, entre as cepas analisadas nenhuma possuía todos os marcadores de patogenicidade pesquisados. Os marcadores mais frequentemente encontrados foram a sensibilidade para a pesticina, reação da esculina negativa e amplificação do gene *ail*. A presença desses três marcadores foi observada em 50% das cepas suínas, a reação da esculina negativa e amplificação de *ail* em 25% das cepas, a sensibilidade à pesticina e reação da esculina negativa em 16,5% das cepas e a sensibilidade à pesticina e amplificação de *ail* em 8,5% das cepas. A cepa Ye 41 isolada de suíno sadio apresentou a maioria dos marcadores de patogenicidade pesquisados: presença do plasmídio de virulência, dependência ao cálcio, receptor para pesticina, reação da esculina negativa, além da presença do gene *irp2* marcador do fenotipo altamente patogênico. Portanto esta cepa pode ser considerada altamente patogênica e sua disseminação no meio ambiente através das fezes dos animais infectados poderá acarretar sérios problemas para o futuro. Esta cepa, embora pertencente ao mesmo bio/soro/fagotipo (4/O:3/VIII) das outras 15 amostras de *Y. enterocolitica* isoladas de suínos sadios, foi a única que apresentou um perfil genotípico diferente das demais, em um estudo de tipagem pela técnica RAPD-PCR (resultados a serem apresentados em outro trabalho).

Quanto às cepas humanas apenas uma, do sorotipo O:6 possuía os três marcadores. Na cepa do sorotipo O:4 foi observado sensibilidade à pesticina e amplificação de *ail*. Enquanto que as cepas dos sorotipos O:5 e O:13 cada uma só possuía um marcador: sensibilidade à pesticina em uma e presença de *ail* em outra, respectivamente. A ausência da maioria dos marcadores de patogenicidade em três cepas humanas foi surpreendente, uma vez que as mesmas foram isoladas enquanto se procurava identificar agentes patogênicos em fezes de indivíduos enfermos, ao contrário das cepas suínas, que foram isoladas de animais aparentemente sadios. Estes resultados poderiam sugerir instabilidade de alguns segmentos do cromossoma destas bactérias e sua perda, seja pela estocagem prolongada ou pelas manipulações a

que foram submetidas após o isolamento evidenciam a importância da caracterização fenotípica e genotípica das cepas logo após o isolamento.

Agradecimentos.- Ao Dr. Ernesto Hofer, pelo fornecimento das cepas de *Yersinia enterocolitica* e à Sra. Yara M. M. Nakasawa, pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS

- Almeida A.M.P., Guiyoule A., Guilvout I., Iteman I., Baranton G. & Carniel E. 1993. Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathogen.* 14:9-21.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Beesley E.D. & Surgalla M.J. 1970. Pesticinogeny: a characteristic useful for presumptive identification and isolation of *Pasteurella pestis*. *Appl. Microbiol.* 19:915-918.
- Birnboim H.C. & Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Ac. Res.* 7:1513-1523.
- Bottone E.J. 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:211-241.
- Carniel E., Mercereau-Puijalon O. & Bonnefoy S. 1989. The gene coding for the 190000 dalton iron regulated protein of *Yersinia* species is present only in the highly pathogenic species. *Infect. Immun.* 57:1211-1217.
- Carniel E., Guiyule A., Mercereau-Puijalon O. & Mollaret H.H. 1991. Chromosomal marker for the "high pathogenicity" phenotype in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 12:192-197.
- Castro A.F.P., Ricci L.C., Almeida A.C.P. & Oliveira M.S. 1983. Virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs. *Revta Microbiol., São Paulo*, 14:48-54.
- Ceccarelli V.R.S.M., Schmidt C. & Trabulsi L.R. 1990. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em um laboratório da cidade de São Paulo. *Revta Microbiol., São Paulo*, 21:364-365.
- Gemski P., Lazere J.R. & Casey T. 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.
- Guilvout I., Mercereau-Puijalon O., Bonnefoy S., Pugsley A.P. & Carniel E. 1993. High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belong to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. *J. Bacteriol.* 175:5488-5504.
- Heeseman J., Hantke T., Vocke E., Saken A., Rakin I., Stojiljkovic I. & Berner R. 1993. Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane protein of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.* 8:397-408.
- Hertman I. & Ben-Gurion R. 1958. A study of pesticin biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* 21:135-143.
- Hofer E., Fernandes M.F.T., Veiga T., Oliveira M.S. & Abraham A.M. 1979. Isolamento de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* de roedores capturados no município de Friburgo, RJ. X Congr. Bras. Microbiologia, Rio de Janeiro.
- Lindler L.E. & Tall B.D. 1993. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. *Mol. Microbiol.* 8:311-324.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 368-369.
- Mendonça C.L., Lázaro N.S., Duque V.M. & Hofer E. 1995. Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos sadios, Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 15(1):11-14.
- Miller V.L. & Falkow S. 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56:1242-1248.
- Miller V.L., Farmer III J.J., Hill W.E. & Falkow S. 1989. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* 57:121-131.
- Miller V.L., Bliska J.B. & Falkow S. 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* 172:1062-1069.
- Nunes M.P., Toledo M.R.F. & Ricciardi I.D. 1984. Invasibilidade e enterotoxigenicidade de *Yersinia enterocolitica* e das espécies atípicas de *Yersinia* isoladas do homem e de cães no Brasil. *Revta Microbiol., São Paulo*, 15:222-226.
- Nunes, P.M., Ricciardi, I.D. 1986. *Yersinia enterocolitica*: isolamento concomitante de fezes de humanos e cão. *Revta Microbiol., São Paulo*, 17:220-224.
- Rakin A., Saken E., Harmsen D. & Heeseman J. 1994. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol. Microbiol.* 13:253-263.
- Sodeinde O.A. & Goguen J.D. 1988. Genetic analysis of the 9,5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 56:2743-2748.
- Straley S.C. & Perry R.D. 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol.* 3:310-318.
- Tassinari A.D., Franco B.D.G.M. & Landgraf M. 1994. Incidence of *Yersinia* spp. in food in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 263-270.
- Toledo M.R.F., Serafim M.B., Horton D.S.P.Q. & Falcão D.P. 1982. Pesquisa de fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica*. *Revta Microbiol., São Paulo*, 13:143-150.
- Warnken M.B., Nunes M.B. & Noletto A.L.S. 1987. Incidence of *Yersinia* in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Prot.* 50:578-579.