



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública



Mirele Regina de Araújo Nepomuceno

**Epidemiologia Molecular das cepas de *Yersinia pestis*
isoladas no Nordeste do Brasil pela Análise do Número
Variável de Repetições em Tandem (MLVA)**

RECIFE
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGUEU MAGALHÃES
DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA**

MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA

Mirele Regina de Araújo Nepomuceno

**Epidemiologia Molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Nordeste
do Brasil pela Análise do Número Variável de Repetições em Tandem
(MLVA)**

Recife

2009

Mirele Regina de Araújo Nepomuceno

**Epidemiologia Molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Nordeste do Brasil pela
Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA)**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Albino
Co-Orientadora: Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife
2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

N441e Nepomuceno, Mirele Regina de Araújo.
Epidemiologia molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Nordeste do Brasil pela análise do número variável de repetições em Tandem (MLVA)/ Mirele Regina de Araújo Nepomuceno, 2009.
93 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino.

1. *Yersinia pestis*. 2. Peste. 3. Variação (Genética). 4. Repetições Mini-Satélites. 5. Sequências Repetidas em Tandem. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Título.

CDU 616.98

MIRELE REGINA DE ARAÚJO NEPOMUCENO

**Epidemiologia Molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Nordeste do Brasil pela
Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA)**

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM / FIOCRUZ) – Departamento de Microbiologia

Membro Externo / Titular: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Departamento de Bioquímica

Membro Externo / Suplente: Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM / FIOCRUZ) – Departamento de Microbiologia

Membro Interno / Titular: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM / FIOCRUZ) – Departamento de Imunologia

Membro Interno / Suplente: Dra. Janaína Campos de Miranda

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM / FIOCRUZ) – Departamento de Microbiologia

Dedico este trabalho a minha
mãe, Margaret, e ao meu
esposo, Vilmar, por sempre
acreditarem em mim!

AGRADECIMENTOS

A minha mais que orientadora, a minha amiga Cris. A dedicação e carinho que ela tem pelo que faz tornaram o desenvolvimento do mesmo muito mais prazeroso. Os seus ensinamentos e ajuda foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Betânia que esteve comigo desde o início da minha vida científica e sempre consegue acalmar nas horas mais complicadas de pré apresentações.

A minha mãe, por ser a pessoa que mais acredita em mim, muitas vezes mais até que eu mesma!

Ao meu esposo Vilmar pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha pequena, minha irmã Amanda, que mesmo sem entender muito do que se trata fazer um mestrado não poupava preocupações e questionamentos: “Mi, e o mestrado? Ta tudo certo?”

Ao Dr. Valdir Balbino por toda ajuda com as análises da parte de bioinformática.

Aos amigos do laboratório de microbiologia; Mari, Rosanny, Camila, Ana Paula, Paloma, Vladimir, Fabão, Thiago e Ednaldo que estão sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos Issac e Silvana, técnicos do laboratório de microbiologia do CpqAM, pela ajuda indispensável em todas as etapas deste trabalho.

A minha amiga Rochane, por estar presente em minha vida desde criança (mesmo sem saber) e por estar sempre disposta a me ajudar em tudo que preciso, inclusive com o ABSTRACT deste trabalho.

Minha gratidão a todas as pessoas que se sensibilizaram e viabilizaram a concretização deste trabalho.

RESUMO

A *Yersinia pestis* é o agente que causa a peste, uma doença primária de roedores, transmitida pelas pulgas infectadas e que pode infectar o homem e outros mamíferos. A epidemiologia molecular auxilia no monitoramento de surtos de infecções, reconhecimento de clones virulentos, relação clonal entre cepas e monitoramento de programas de controle ou erradicação das doenças. Diferentes métodos moleculares (RAPD, PCR-Ribotipagem, PCR-IS, MLVA e PFGE) foram aplicados na tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis*. No entanto, a Análise do Número Variável de Repetições em Tandem – MLVA conseguiu estabelecer relação com algumas características epidemiológicas e revelou diversidade genética entre um grupo de cepas de *Y. pestis* de diferentes focos do Nordeste do Brasil. Contudo, ainda existe incoerência nos resultados obtidos com as diferentes ferramentas moleculares. Diante disto, é necessário obter um sistema de tipagem adequado para esclarecer se existe diversidade nas cepas de *Y. pestis* dos focos do Nordeste do Brasil. A obtenção de marcadores capazes de diferenciar cepas de diversos focos, disseminados em vários países, tem interesse epidemiológico, pois poderá identificar os clones de *Y. pestis* existentes no Brasil, esclarecendo se existe diversidade entre as cepas brasileiras de *Y. pestis*, além de ser útil na detecção de um novo clone ou na introdução de uma nova cepa. Este trabalho teve como objetivo realizar a tipagem de 63 cepas de *Y. pestis* originadas de diferentes municípios de três focos de peste do estado de PE. As cepas foram isoladas de diferentes fontes (humano, roedor e pulga) e períodos (1966 a 1980). Das 63 cepas, 20 foram isoladas durante um epizootia, em agosto de 1967, na Chapada do Araripe-PE. Também foram estudadas oito cepas de *Y. pestis* isoladas em outros países, cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* e nove de *Y. enterocolitica* para comparação do perfil genotípico e estabelecer a relação entre elas, além de avaliar o MLVA como marcador molecular. Para isto foram utilizados onze VNTRs pela técnica do MLVA. As amplificações da PCR foram realizadas em termociclador e os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2,0 %. Dos onze VNTRs para as cepas da epizootia apenas um VNTR revelou-se polimórfico apresentando diferentes alelos. Os demais VNTRs revelaram-se monomórficos. Entre os onze VNTRs analisados para as 51 cepas de *Y. pestis* (43 brasileiras e 8 estrangeiras) dois se revelaram monomórficos gerando *amplicons* com 7 e 2 unidades repetitivas (UR). Os outros nove VNTRs analisados revelaram-se polimórficos gerando dois a oito alelos. As cepas de *Y. pseudotuberculosis* apresentaram-se polimórficas para 10 VNTRs gerando *amplicons* de tamanhos diversos, o VNTR ms09 foi o único monomórfico gerando um *amplicon* de 700 pb com 28UR. Das nove cepas de *Y. enterocolitica* analisadas com os onze locos, sete apresentaram-se monomórficos com *amplicons* de 700, 250, 270, 690, 231 e 379 pb. Os outros quatro VNTRs analisados apresentaram um padrão de amplificação polimórfico gerando *amplicons* de tamanhos diferentes para o mesmo loco. O padrão de amplificação gerado com as cepas de *Y. pestis* possibilitou distribuí-las em 35 perfis genotípicos. As análises revelaram diversidade genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes e períodos e sua continuação poderá gerar dados importantes para estabelecer relações filogenéticas entre as cepas, contribuindo para um melhor entendimento da disseminação e transmissão do agente etiológico da peste na natureza e a dinâmica da epidemiologia da peste no Brasil.

Palavras Chave: *Yersinia pestis*, diversidade genética, VNTR, MLVA, Peste.

ABSTRACT

The *Yersinia pestis* is the agent who causes the plague, a primary illness of rodents, transmitted by infected fleas and it can infect human and other mammals. The molecular epidemiology assists in the monitoring of outbreaks of infections, recognition of virulent clones, relation between clone strands and monitoring of programs of control or eradication of the illnesses. Different molecular methods (RAPD, PCR-Ribotyping, PCR-IS, MLVA and PFGE) had been applied in molecular typing of *Y. pestis* Brazilian strains. However, the Multiple Locus Variable Analysis – MLVA obtained to establish relation with its epidemiological characteristics and disclosed genetic diversity between an *Y. pestis* strain group of different focus Brazil northeast. However, still have incoherence in the results gotten with the different molecular tools exists. Ahead of this, it's necessary to get an adjusted typing system to clarify if exist diversity in *Y. pestis* strains of Brazil northeast foci. The attainment of markers capable to differentiate strains of diverse foci, spread in some countries, has epidemiological interest, therefore it will be able to identify *Y. pestis* clones existing in Brazil, clarifying if exists diversity between *Y. pestis* Brazilian strains, beyond being useful in the detection of new clone or the new strain introduction. This work had as objective to carry through the typing of 63 *Y. pestis* strains originated of different cities in Brazil northeast foci. The strains had been isolated of different sources (human, rodents and fleas) and periods (1966 until 1980). By 63 strains, 20 had been isolated during an epizootic, 1967 August, in Chapada of Araripe – PE. Also it had been studied eight *Y. pestis* strains isolated in other countries, five *Y. pseudotuberculosis* strains and nine *Y. enterocolitica* strains for comparison of the genotypic profile and to establish the relation between them, beyond evaluating the MLVA like a marking molecular. For this purpose, it had been used eleven VNTRs for the MLVA. The PCR amplifications had been carried through thermocycler and the amplification products had been separate in 2.0% agarose gel. Of the eleven VNTRs for epizootic strains only one VNTR showed polymorphic presenting different alleles. The majority VNTRs had shown monomorphics. From 51 *Y. pestis* strains (43 Brazilians and 8 foreigners) two between eleven VNTRs analyzed had disclosed to monomorphics generating amplicons with 7 and 2 repetitive units (UR). The others nine VNTRs analyzed had shown polymorphics generating the two until eight alleles. From 10 VNTRs for *Y. pseudotuberculosis* strains had been presented polymorphics, generating amplicons of diverse sizes. The ms09 VNTR was the only monomorphic generating one amplicon of 700 pb with 28UR. From nine *Y. enterocolitica* strains analyzed with the eleven VNTRs, seven had been presented monomorphics with amplicons by 700, 250, 270, 690, 231 and 379 pb. The others four analyzed VNTRs had presented a polymorphic standard of amplification for *Y. enterocolitica* strains, showing amplicons of different sizes for the same locus. The standard of amplification generated with *Y. pestis* strains possible classify them in 35 genotypic profiles. The analyses had disclosed genetic diversity between *Y. pestis* strains isolated of different sources and periods and its continuation will be able to generate given important to establish phylogenetic relations between the *Y. pestis* Brazilian strains, contributing for a better understanding of the dissemination and transmission of the plague's agent etiologic in the nature and the dynamics of the plague epidemiology in Brazil.

Words Key: *Yersinia pestis*, genetic diversity, VNTR, MLVA, Plague.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Áreas de Peste no Brasil.....	16
Figura 2:	Esquema do ciclo epidemiológico da Peste	19
Figura 3:	Vizualização por microscopia óptica da <i>Y. pestis</i> (seta) em tecido de um paciente infectado.....	20
Figura 4:	Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguinais (C e D).....	22
Figura 5:	Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Y. pestis</i>	26
Figura 6:	Esquema representativo do VNTR tetranucleotídeo CAAA	32
Figura 7:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	53
Figura 8:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	54
Figura 9:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	55
Figura 10:	Dendrograma UPGMA mostrando a relação das cepas de <i>Yersinia</i> estudadas, os números de unidades repetitivas de cada cepa com os onze locos VNTRs e seus perfis genotípicos. I – V: número de clados	56
Figura 11:	Gráfico de barras demonstrando a relação entre os VNTRs e o número de alelos encontrados nas diferentes espécies de <i>Yersinia</i>	57
Figura 12:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTRs em culturas das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas durante a epizootia.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas nos focos do Nordeste do Brasil e Perfis Genotípicos gerados neste estudo.....	49
Tabela 2: Características das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas durante uma epizootia de Peste na Chapada do Araripe – PE, data de isolamento e procedência das cepas. Resultado da análise pelo MLVA com o VNTR ms06	50
Tabela 3: Dados epidemiológicos e perfis genotípicos das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas em focos de outros países.....	51
Tabela 4: Dados epidemiológicos das cepas de <i>Y. pseudotuberculosis</i> e <i>Y. enterocolitica</i> estudadas com os 11 VNTRs analisados e os perfis genotípicos gerados	51
Tabela 5: Características dos VNTRs analisados nas cepas de <i>Yersinia</i>	52

LISTA DE ABREVIACÕES

BAB	Blood Agar Base
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IS	Seqüência de Inserção
Kb	Kilobases
MLVA	Análise de Múltiplos Locos do Número Variável de Repetições em Tandem (Análise do VNTR)
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RFLP	Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
SRP	Serviço de Referência em Peste
TBE	Tris-Borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tris: EDTA
UR	Unidade Repetitiva
UV	Ultra Violeta
VNTR	Número Variável de Repetições em Tandem
RAPD	Polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Histórico da Peste	14
2.2	Definição da Peste	15
2.3	Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo	15
2.4	Epidemiologia da Peste	17
2.5	Agente Etiológico da Peste	19
2.6	Formas Clínicas	21
2.7	Diagnóstico Laboratorial da Peste	22
2.7.1	<i>Diagnóstico Bacteriológico</i>	23
2.7.1.1	<u>Exame Direto</u>	23
2.7.1.2	<u>Cultura</u>	23
2.7.2	<i>Diagnóstico Sorológico</i>	24
2.7.3	<i>Diagnóstico Molecular</i>	24
2.8	Tratamento, Prevenção e Controle da Peste	24
2.9	Genoma da <i>Yersinia pestis</i>	26
2.9.1	<i>O cromossomo da Yersinia pestis</i>	27
2.9.2	<i>Os plasmídeos da Yersinia pestis</i>	27
2.9.2.1	<u>Plasmídeo pYV ou pCD1</u>	28
2.9.2.2	<u>Plasmídeo pPst ou pCP1</u>	28
2.9.2.3	<u>Plasmídeo pFra ou pMT1</u>	29
2.10	Epidemiologia Molecular	29
3	JUSTIFICATIVA	33
4	PERGUNTA CONDUTORA	35
5	HIPÓTESE	35
6	OBJETIVOS	36
6.1	Geral	36

6.2	Específicos.....	36
7	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
7.1	Cepas Estudadas.....	37
7.2	Bactérias e Condições de Cultivo.....	37
7.3	Extração do DNA Genômico.....	38
7.4	Tipagem molecular pela análise dos múltiplos locos VNTR (MLVA)	39
7.5	Análise dos Dados obtidos pelo MLVA.....	40
7.5.1	<i>Determinação do Número de Repetições.....</i>	40
7.5.2	<i>Análise discriminatória dos locos VNTRs</i>	40
8	RESULTADOS	42
8.1	Tipagem Molecular pelo MLVA (Análise dos VNTRs)	42
8.1.1	<i>Análise das cepas de Y. pestis isoladas nos três focos de peste do estado de PE e de focos de outros países</i>	42
8.1.2	<i>Análise das cepas de Y. pestis isoladas durante uma epizootia de peste em 1967 no foco da Chapada do Araripe – PE</i>	45
8.1.3	<i>Análise das cepas de Y. pseudotuberculosis</i>	45
8.1.4	<i>Análise das cepas de Y. enterocolitica</i>	47
9	DISCUSSÃO	59
10	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	APÊNDICE A – Artigo Científico.....	74
	APÊNDICE B – Normas editoriais da revista Letters in Applied Microbiology (ISSN: 1364-5072)	91

1 INTRODUÇÃO

A *Yersinia pestis*, bactéria gram-negativa, da família Enterobacteriaceae, é o agente causador da Peste, uma doença primária de roedores geralmente transmitida pela picada de pulgas infectadas. O homem se contamina acidentalmente ao entrar no ecossistema da infecção. Equivocadamente, a população e os profissionais de saúde consideram a Peste como uma doença já extinta, no entanto ela ainda persiste nos dias atuais entre diversos hospedeiros / reservatórios em numerosos focos silvestres de vários países da África, Ásia e do Continente Americano. No Brasil a incidência de Peste humana e a ocorrência de epizootias declinaram nas áreas de foco, entretanto, atividade residual de Peste tem sido detectada nos animais sentinelas, exigindo vigilância permanente dos focos. O último surto de Peste no Brasil ocorreu em 1986, no estado da Paraíba. Em 1997 ocorreu um caso humano no Ceará e apenas em 2005 houve outro caso sorológico de Peste humana também no Ceará.

A Peste foi introduzida no Brasil, em 1899, pelo porto de Santos-SP durante a última pandemia, focalizando-se principalmente no Nordeste, tornando-se um agravo de interesse regional. Os focos brasileiros atualmente estão localizados nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

A vigilância da Peste no Brasil baseia-se na pesquisa da bactéria em roedores e pulgas e de anticorpos antipestosos em animais sentinela (algumas espécies de roedores resistentes à infecção e carnívoros domésticos, como os cães e gatos). A partir de 1966, com o Plano Piloto de Peste em Exu (PPP), as atividades de vigilância e controle da Peste no Brasil permitiram a obtenção de 917 cepas de *Y. pestis* oriundas de roedores, pulgas e humanos, com o último espécime sendo isolado em 1997 e que são conservadas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM).

A tipagem molecular dos microrganismos é importante para a epidemiologia porque auxilia no monitoramento de surtos de infecções, reconhecimento de clones virulentos, relação clonal entre cepas e avaliação de programas de controle ou erradicação das doenças.

Apesar dos vários estudos realizados com *Y. pestis* utilizando diferentes técnicas moleculares, nenhuma correlação entre as diferenças observadas e as características epidemiológicas dos isolados foi encontrada. Além de apresentarem um baixo poder discriminatório, revelando na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas

oriundas de diferentes fontes, ano e local de isolamento, demonstrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos.

O MLVA é uma técnica que tem sido padronizada pelo laboratório de Microbiologia do CPqAM que consiste na Análise do Número Variável de Repetições em Tandem e vem mostrando poder discriminatório entre as cepas brasileiras de *Y. pestis*. Os resultados obtidos demonstraram baixa diversidade genética intra-específica nas cepas estudadas, sugerindo que a diversidade genética das cepas brasileiras foi subestimada. No entanto, os dados obtidos até o momento contribuirão para uma melhor compreensão da epidemiologia da peste e para a estrutura populacional da bactéria no Brasil.

A obtenção de marcadores capazes de diferenciar cepas provenientes de diversos focos, disseminados em numerosos países, tem interesse epidemiológico, pois poderá identificar os clones de *Y. pestis* existentes no Brasil e detectar o surgimento de um novo clone ou a introdução de uma nova cepa.

A proposta do presente trabalho foi caracterizar as cepas da coleção de *Y. pestis* isoladas nos três focos de peste do estado de PE entre os anos de 1966 a 1980, pela técnica do MLVA, analisando 11 locos VNTRs, para estabelecer a relação clonal das cepas e com isso tentar obter um marcador molecular capaz de identificar o perfil genético entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* existentes na bacterioteca do SRP/CPqAM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Peste

A peste teve origem provavelmente no Planalto Central Asiático e foi responsável por grande mortalidade em diferentes épocas (PERRY; FETHERSTON, 1997). Muitas vezes a história da peste é confundida com o próprio registro histórico da humanidade. Casos de peste foram relatados em vários textos antigos, inclusive no Antigo Testamento, no II Livro de Samuel (GAGE; KOSOY, 2005). Apesar de várias doenças terem sido erroneamente classificadas como peste durante a era Cristã, três grandes pandemias foram bem caracterizadas.

A primeira pandemia, denominada Peste de Justiniano (542-605 d.C) teve origem no Egito e se disseminou por todo mundo civilizado, atingindo Ásia, África e Europa. Estima-se que esta pandemia chegou a matar 100 milhões de pessoas (PERRY; FETHERSTON, 1997).

A segunda pandemia, a temível Peste Negra, teve início na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia entre os anos de 1347 e 1353 (PERRY; FETHERSTON, 1997).

A terceira pandemia, ou Pandemia Contemporânea, originou-se na Mongólia estendendo-se para Hong Kong em 1894 e rapidamente se espalhou pelo mundo, através do transporte marítimo, para os Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Madagascar (PERRY; FETHERSTON, 1997; POLLITZER, 1954). A expansão desta pandemia declinou com a Segunda Guerra Mundial, devido à substituição dos antigos navios pelos novos a prova de ratos. No entanto, foi a partir dela que se estabeleceram vários focos endêmicos espalhados por todos os continentes, exceto na Austrália (MOLLARET, 1989).

Em junho de 1884, Alexander Yersin isolou o agente etiológico da peste e em 1898 Paul - Louis Simond descobriu o papel da pulga na transmissão da doença (GAGE; KOSOY, 2005). Yersin descreveu a doença em Hong Kong, verificou que 75% dos casos eram devido à peste bubônica e ainda relatou a relação entre ratos e a peste (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

Em todos os continentes ainda são encontrados focos estáveis de peste, embora a taxa de mortalidade e disseminação dos surtos esporádicos que ocorrem atualmente seja reduzida. Assim a peste ainda é considerada como um problema em saúde pública em alguns países e está

classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma doença reemergente devido ao aumento do número de casos relatados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

A peste chegou ao Brasil em 1899, durante a última pandemia, pelo porto de Santos no estado de São Paulo, onde ocorreu o primeiro caso humano da doença, quando o navio Zeyer, procedente de Roterdã, chegou ao Brasil e trouxe com ele a doença. No início a peste alcançou várias cidades litorâneas (peste portuária), em seguida pelas estradas de ferro e outras vias atingiu várias cidades do interior (peste urbana) de onde foi eliminada por medidas sanitárias adequadas, mas focalizou-se na zona rural (peste silvestre) entre os roedores silvestres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1965).

A peste chegou a Pernambuco pela cidade do Recife em 1902 devido à difusão da doença para as cidades litorâneas. A partir de 1906, a doença dispersou-se pelas rotas comerciais terrestres e fluviais, instalando-se entre os roedores silvestres em áreas rurais, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. Essas regiões apresentavam condições ecológicas adequadas para a sobrevivência do bacilo, como a presença dos roedores reservatórios (ALMEIDA et al., 1985; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1965).

2.2 Definição da peste

A peste é uma zoonose, primordialmente uma doença de roedores, causada pela bactéria *Y. pestis*, transmitida de um animal ao outro através da picada de pulgas infectadas. O homem é infectado acidentalmente quando penetra no ecossistema dos roedores reservatórios da infecção, em atividades de caça, agricultura, ou lazer. Em circunstâncias especiais a peste pode ser transmitida de homem a homem (ALMEIDA et al., 2005).

2.3 Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo

No Brasil existem dois principais focos naturais de peste: na região Nordeste e na Serra dos Órgãos, no estado do Rio de Janeiro. O foco do Nordeste está localizado na região semi-árida do Polígono da Seca, que se estende do estado do Ceará ao Norte de Minas Gerais. Este

foco está situado em regiões serranas como a Serra da Ibiapaba e de Baturité (Ceará), Chapada do Araripe (Pernambuco, Ceará e Piauí), Chapada da Borborema (Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas), na Serra de Triunfo (Paraíba e Pernambuco), Planalto Oriental (Bahia) e piemonte da Chapada Diamantina (Minas Gerais). Ainda existe outra zona pestosa no estado de Minas Gerais, fora do Polígono das Secas, o Vale do Rio Doce. O foco da Serra dos Órgãos abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, do estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al., 2005) (Figura 1).



Figura 1: Áreas de Peste no Brasil.
Fonte: Almeida et al. (2005).

O foco do Nordeste produzia até 1980 de 20 a 100 casos de peste por ano, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. Desde então, houve um decréscimo substancial no registro dos casos. Os últimos registros de peste humana ocorreram nos Estados do Ceará e Paraíba nos anos 80. Durante a última década, alguns casos humanos suspeitos, clínicos e

epidemiologicamente ainda foram notificados no Ceará e na Bahia. Contudo, somente dois deles, ocorridos no Ceará, foram confirmados, um por isolamento da bactéria, em Ipu no ano de 1997 e, um por exame sorológico, em Guaraciaba do Norte no ano de 2005, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos (ALMEIDA et al., 2005).

Nos focos de Minas Gerais e Rio de Janeiro não há notificação de casos humanos há décadas e raramente foram encontrados anticorpos antipestosos nos animais sentinelas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). A história do foco da Serra dos Órgãos resume-se a cinco surtos de curta duração, com o último ocorrendo em 1967, com oito casos humanos e duas mortes (ALMEIDA et al., 2005; COURA et al., 1967).

Nos últimos dez anos, graves epidemias de peste foram registradas na África principalmente em Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia, e recentemente na RDC (República Democrática do Congo). Casos esporádicos de peste têm ocorrido em vários países das Américas (EUA, Peru, Brasil e Bolívia), na Ásia Central (Uzbequistão, Turcomenistão e Kazakhstão), China, Mongólia e Vietnam (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Em 2006, um total de 13 casos de peste humana foi registrado entre habitantes de quatro estados dos EUA: Novo México (sete casos), Colorado (dois casos), Califórnia (três casos) e Texas (um caso). Este é o maior número de casos registrados em um ano nos Estados Unidos desde 1994 (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT, 2006). Depois de décadas de silêncio a peste reemergiu na Índia, Argélia e Equador (BERTHERAT, 2006).

2.4 Epidemiologia da Peste

A transmissão da peste ocorre principalmente pela picada da pulga infectada. A pulga também pode infectar outros animais como coelhos, camelos, cães e gatos (PERRY; FETHERSTON, 1997). A peste pode acometer o homem quando ele interfere no ciclo selvático, durante ou após uma epizootia, ou pela introdução de roedores silvestres, ou de pulgas infectadas no habitat humano (ALMEIDA et al., 2005) (Figura 2).

A peste está incluída, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre as doenças re-emergentes, em vista da ocorrência de epidemias em vários países da África, Ásia e do Continente Americano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). No Brasil a incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias declinaram nas áreas de foco, entretanto,

atividade residual de peste tem sido detectada nos animais sentinelas, exigindo vigilância permanente dos focos.

Os roedores são os principais reservatórios da peste e estima-se que cerca de 200 espécies estejam envolvidas no ciclo epidemiológico da doença. Nos focos do Nordeste do Brasil, os principais roedores envolvidos pertencem aos gêneros: *Bolomys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Galea*, *Trychomys* e *Rattus*. Alguns roedores, como o *Galea* (preás) e *R. rattus* (ratos), são pouco suscetíveis à doença, enquanto outros, como o *Bolomys*, são muito sensíveis, passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção (KARIMI et al., 1974).

As pulgas são vetores do bacilo da peste. Das 1.200 espécies de pulgas conhecidas, 55 são encontradas no Brasil e as espécies *Polygenis bohlsi jordani* e *P. tripus* são os principais vetores da peste entre os roedores. A *Xenopsylla cheopis* e *Pulex irritans* também participam da transmissão. A *Polygenis sp* quando infectada, transmite a peste entre os roedores e pode ser encontrada, embora em pequeno número, no vestuário ou livres nas moradias (ALMEIDA et al., 2005).

Outros animais como: os lagomorfos (coelhos e lebres), alguns marsupiais (timbú, cassaco), insetívoros (porco-espinho e musaranho), carnívoros selvagens (raposas) e carnívoros domésticos (cães e gatos) assim como os camelos e macacos também podem contrair a infecção. As aves são refratárias à infecção pela *Y. pestis*, mas podem participar eventualmente do ciclo carreando pulgas para outras regiões pelo transporte das carcaças de animais infectados, principalmente as aves de rapina e outras que utilizam as tocas dos roedores para ninho (Figura 2) (STENSETH et al., 2008).

Os animais domésticos (cães e gatos), além de desenvolver a infecção também podem carrear pulgas infectadas pela *Y. pestis* de roedores silvestres para dentro de casa e transmitir a doença por arranhaduras e mordidas (Figura 2). Normalmente os cães não expressam manifestações clínicas, mas os gatos podem apresentar as formas ganglionar, faríngea e a pneumônica, o que os torna extremamente perigosos, pois podem transmitir peste pneumônica para humanos. Os cães e gatos que sobrevivem carregam os anticorpos específicos até durante um ano (ALMEIDA et al., 2005).

A transmissão pessoa a pessoa pode ocorrer por aerossóis na forma pneumônica ou pelo contato com o conteúdo do bubão e ainda por acidentes com tecidos e materiais em trabalhos de campo ou no laboratório ou na utilização da bactéria como agente de guerra biológica (STENSETH et al., 2008; INGLESBY et al., 2000).

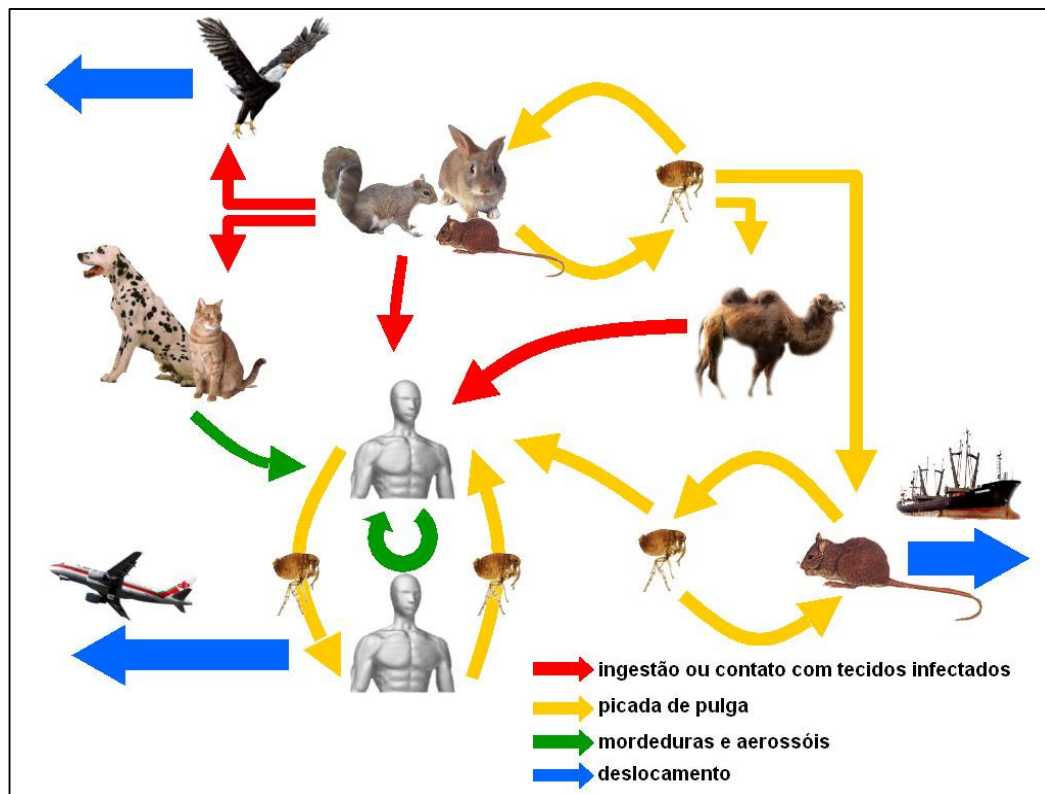


Figura 2: Esquema do ciclo epidemiológico da Peste.

Fonte: Leal-Balbino et al. 2009.

2.5 Agente Etiológico da Peste

A *Y. pestis*, agente causador da peste, é uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae. O gênero *Yersinia* inclui 11 espécies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. mollareti*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. rodhei* e *Y. ruckeri*. A *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são espécies enteropatogênicas e causam distúrbios gastrointestinais. São transmitidas pela via oral-fecal e provocam um quadro clínico denominado yersiniose. A *Y. kristensenii* pode ser enteropatogênica para o homem e a *Y. ruckeri* é um patógeno de peixe (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Normalmente a *Y. pseudotuberculosis* não causa doença em humanos saudáveis, porém em indivíduos imunocomprometidos que ingerem alimentos contaminados, ela pode causar complicações linfáticas (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Pela microscopia óptica a *Y. pestis* apresenta-se como um bacilo curto, ovóide (0,5 a 0,8µm de diâmetro e de 1 a 3µm de comprimento) e de coloração bipolar (extremidades escuras) (Figura 3). É uma bactéria aeróbia ou anaeróbia facultativa, que cresce bem em meios usuais a 28°C e pH entre 5 e 9. O bacilo é imóvel, resistente ao frio, conserva-se em cadáveres e sobrevive em dejetos de pulgas (PERRY; FETHERSTON, 1997).

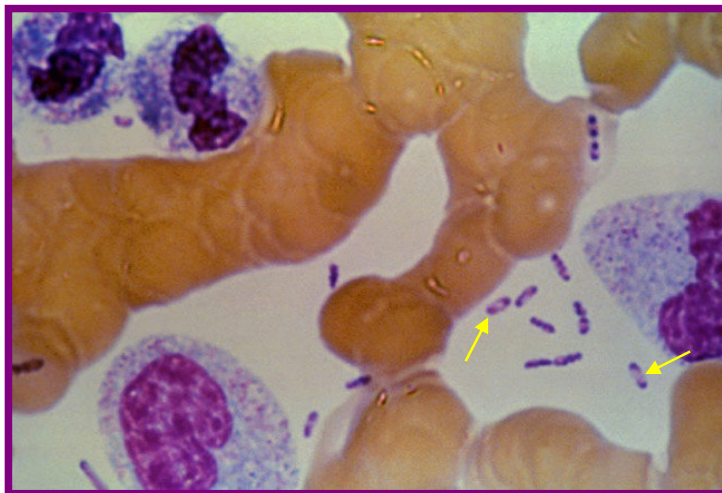


Figura 3: Visualização por microscopia óptica da *Y. pestis* (seta) em tecido sanguíneo de um paciente infectado.
Fonte: <http://www.cdc.gov>.

As cepas de *Y. pestis* são fenotipicamente muito homogêneas, caracterizam-se por apresentar um sorotipo, um fagotipo e três biovars definidos pela capacidade das cepas em fermentar o glicerol e reduzir nitratos a nitritos. Segundo DEVIGNAT (1951) essas variedades foram associadas as três últimas pandemias, o biovar *Antiqua* ou *Continental* (glicerol+, nitrato+) foi associado com a primeira pandemia, *Medievalis* (glicerol+, nitrato-) com a segunda e o biovar *Orientalis* ou *Oceânica* (glicerol-, nitrato+) foi associada com a terceira pandemia. Estes biovars não diferem quanto ao nível de patogenicidade, nem à forma clínica da doença (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Mais recentemente foi caracterizado um novo biovar em uma cepa denominada *Microtus* isolada na China. Esta cepa foi diferenciada por não ter capacidade de utilizar o açúcar arabinose, diferente das outras cepas de *Y. pestis*. O biovar *Microtus* é avirulento para humanos. Diante disso, agora baseado não só na capacidade de fermentar o glicerol e reduzir nitrato a nitrito, mas também na habilidade em fermentar a arabinose, a *Y. pestis* está dividida em quatro

biovars: *Antiqua* (glicerol+, arabinose+ e nitrato+); *Medievalis* (glicerol+, arabinose+ e nitrato-); *Orientalis* (glicerol-, arabinose+ e nitrato+) e *Microtus* (glicerol+, arabinose - e nitrato-) (ZHOU et al., 2004).

2.6 Formas Clínicas

A peste humana pode apresentar três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica. A penetração do bacilo da peste no hospedeiro pode ocorrer pela via sangüínea, pela pele, pela conjuntiva ocular ou através das mucosas respiratórias e digestivas. A inoculação do bacilo pela conjuntiva ocular determina a peste septicêmica, enquanto a via subcutânea reproduz a peste bubônica e pela via respiratória a peste pneumônica (ALMEIDA et al., 2005).

A peste bubônica é a forma mais comum no Brasil, correspondendo a 98% dos casos ocorridos na região Nordeste e caracteriza-se pela presença de um bubão (tumefação dos linfonodos superficiais). O bubão aparece no segundo ou terceiro dia, sendo extremamente doloroso. Quando a picada da pulga ocorre nas regiões superiores surgem os bubões axilares ou cervicais, quando acontece nos membros inferiores formam-se nódulos inguinais ou femurais (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999) (Figura 4). A sintomatologia da peste bubônica é identificada por: calafrios, cefaléia, febre alta, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos e dores generalizadas. O período de incubação é de 2 a 6 dias, porém, em alguns casos é mais rápido (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A peste septicêmica geralmente aparece na fase terminal da peste bubônica não tratada. Esta forma clínica é pouco freqüente e é caracterizada pela presença do bacilo no sangue não apresentando reações ganglionares visíveis. Clinicamente, a peste septicêmica assemelha-se às septicemias causadas por outras bactérias Gram-negativas. Os sintomas são: febre, dor de cabeça, mal estar, calafrios e distúrbios gastrointestinais. Essa forma tem um alto grau de letalidade (30 a 50%) quando não tratada (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A peste pneumônica é a forma mais grave da doença, devido ao seu quadro clínico, sua alta letalidade e seu alto potencial de contágio, podendo provocar epidemias. Pode ser secundária à peste bubônica ou septicêmica por disseminação hematogênica. Também pode ser primitiva, produzida diretamente por contato com tecidos de animais infectados ou inalação de aerossóis de gotículas de outro doente com a pneumonia pestosa ou mesmo de um artefato terrorista, com

inóculos de 100 a 500 bacilos (ALMEIDA et al., 2005). Tem início com um quadro infeccioso grave de evolução rápida, com abrupta elevação térmica, calafrios, arritmia, hipotensão, náuseas, vômitos e perturbação mental. Inicialmente os sinais e sintomas pulmonares são discretos ou ausentes, só depois surgem dores no tórax, respiração curta e rápida, expectoração sanguinolenta, rica em bacilos pestosos. Se não tratada precocemente, surgem os sintomas de delírio e coma podendo causar a morte (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Também existe a “pestis minor”, que diferente dessas formas graves, é uma forma benigna ou ambulatorial, com discreto comprometimento ganglionar, febre baixa e cura espontânea, também é chamada peste benigna (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

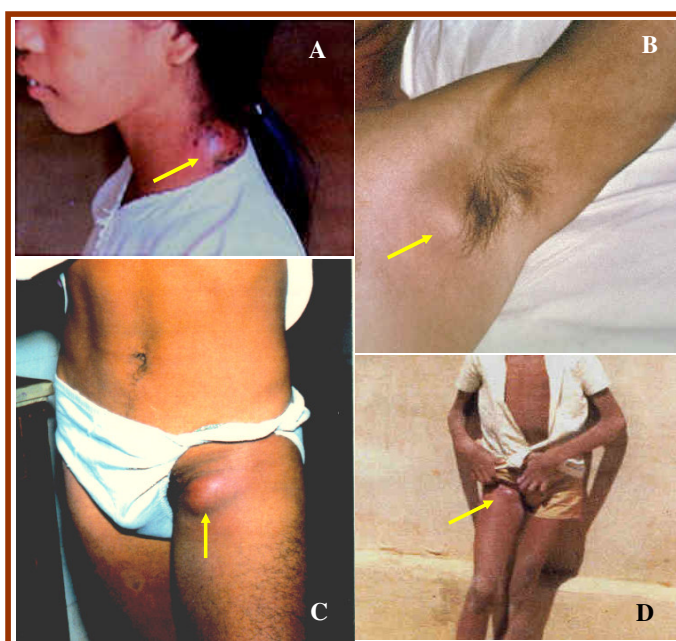


Figura 4: Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguinais (C e D).
Fonte: Manual de Peste - www.cpqam.fiocruz.br/referencia/Peste

2.7 Diagnóstico Laboratorial da Peste

O diagnóstico laboratorial da peste é realizado por técnicas bacteriológicas (identificação e isolamento da bactéria), sorológicas (detecção de anticorpos antipestosos) e mais recentemente por técnicas moleculares. Para análise bacteriológica podem ser utilizadas cepas de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica no homem, além de sangue,

vísceras de roedores e macerados de pulgas. O diagnóstico sorológico é realizado em soro humano, de roedores e de outros mamíferos. O diagnóstico molecular consiste na identificação de genes plasmidiais e/ou cromossomais da *Y. pestis* (CHU, 2000).

A forma mais segura para confirmação da infecção pestosa é o isolamento da bactéria, mas nem sempre as cepas procedentes de casos humanos são possíveis. A punção do bubão é um procedimento cruento e doloroso, mesmo com a utilização de anestesia local, e que determina em alguns casos o agravamento do quadro clínico (ALMEIDA et al., 2005).

2.7.1 Diagnóstico Bacteriológico

2.7.1.1 Exame Direto

O diagnóstico bacteriológico por exame direto emprega as técnicas de coloração pelo método de Gram, corante de Wayson ou método de Giemsa. Para as análises são utilizados esfregaços de aspirado de bubão, cepas de sangue, medula, vísceras dos roedores e macerados de pulgas (CHU, 2000).

2.7.1.2 Cultura

Para identificação da *Y. pestis* as cepas são cultivadas em duas placas para Agar sangue (Blood Agar Base = BAB, Difco) a 28°C em pH na faixa de 7,4 a 7,6 por 48 a 72 horas. Depois do semeio adiciona-se uma gota do fago antipestoso específico em uma das placas. As colônias apresentam tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante-translúcido e bordas inteiras. No ponto da cultura onde foi colocado o bacteriófago forma-se uma área de lise das colônias (KARIMI, 1978).

2.7.2 Diagnóstico Sorológico

A técnica de hemaglutinação (HA) é a mais utilizada no diagnóstico sorológico. Essa técnica consiste da utilização de hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno capsular F1 da *Y. pestis* para detecção de anticorpos em soros de humanos, roedores e carnívoros (CHU, 2000).

2.7.3 Diagnóstico Molecular

A utilização da biologia molecular no diagnóstico da peste é uma opção em que se identificam genes plasmidiais e cromossomais da *Y. pestis* em cepas de humanos, roedores e pulgas. As técnicas moleculares permitem um diagnóstico da peste mesmo quando as bactérias estão inviáveis (ALMEIDA et al., 2005).

Diferentes protocolos foram desenvolvidos baseados na técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e suas variações para o diagnóstico da peste em pulgas, material de roedores ou humanos (CHASE et al., 2005; LOIEZ et al., 2003). No laboratório de microbiologia do SRP/CPqAM já foram padronizadas algumas delas; Nested-PCR (LEAL et al., 1996), Multiplex-PCR (LEAL; ALMEIDA, 1999) e NPCRTbU (SOUZA, 2005).

2.8 Tratamento, Prevenção e Controle da Peste

O tratamento da peste deve ser precoce e intensivo devido à rapidez e a gravidade da evolução da doença, visando deter a bacteremia e superar a toxemia. A coleta de espécimes para os exames bacteriológicos deve ser realizada antes do uso do antimicrobiano, mas não se pode retardar os procedimentos a espera da confirmação laboratorial. No CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) recomenda-se o isolamento do paciente durante as primeiras 48 horas do tratamento devido ao risco de pneumonia (ALMEIDA et al., 2005).

A *Y. pestis* é sensível à maioria dos antibióticos, com exceção da penicilina e derivados. Embora os testes laboratoriais demonstrem sensibilidade da *Y. pestis* à penicilina, esta é completamente ineficaz *in vivo* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). A estreptomicina e gentamicina são eficazes no tratamento da peste. A estreptomicina é considerada o padrão-ouro no tratamento da peste e é uma indicação bastante utilizada no caso de pneumonia. Há autores que recomendam a associação da estreptomicina com a tetraciclina ou com o cloranfenicol, principalmente nos casos com pneumonia e meningite. A gentamicina é uma excelente opção terapêutica em quaisquer situações, podendo ser indicada para gestantes e crianças. A tetraciclina é um antimicrobiano usado no tratamento de casos não complicados. O cloranfenicol é considerado uma boa alternativa no tratamento da peste bubônica, septicêmica e pneumônica. As sulfonamidas são conhecidas pela sua eficácia na prevenção e tratamento apenas dos casos não complicados, mas só devem ser usados quando outros antimicrobianos mais potentes não estiverem disponíveis (ALMEIDA et al., 2005).

Uma cepa de *Y. pestis* com resistência aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da peste foi isolada em Madagascar. Esta resistência está relacionada à aquisição de um plasmídeo, o pIP1202, que pode ser transmitido para outras cepas disseminando esse padrão de resistência (GALIMAND et al., 1997).

A vigilância da peste no Brasil baseia-se no rastreamento da infecção nos campos através da captura de roedores suscetíveis, coleta de pulgas e pesquisa da bactéria nestas fontes, além de inquéritos sorológicos entre roedores e outros pequenos mamíferos e em animais sentinelas e o controle é realizado pela eliminação das pulgas com inseticidas apropriados, pela desratização e a antiratização, que consiste da destruição de abrigos e alimentação para os roedores, nas áreas endêmicas de peste (ALMEIDA et al., 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O uso de vacinas é recomendável apenas para indivíduos que estão continuamente expostos à situação de risco. Estes indivíduos compreendem profissionais que trabalham em contato com roedores e manipulam cepas vivas. No entanto, a imunidade que a vacinação confere é pouco eficaz contra a peste bubônica e não protege contra a pneumônica primária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999). Assim sendo ela pode até representar um risco, pois pode induzir ao vacinado uma falsa sensação de proteção, o que pode levar a exposição de risco, no foco, hospital ou laboratório (ALMEIDA et al., 2005).

2.9 Genoma da *Yersinia pestis*

Os fatores de virulência da *Y. pestis* são codificados no cromossomo e nos três plasmídeos (pPst, pFra e pYV) presentes no genoma da bactéria (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004) (Figura 5). O sequenciamento completo do genoma de algumas cepas: CO92 (PARKHILL et al., 2001), KIM (DENG et al., 2002), 91001 (SONG et al., 2004) e Antiqua e Nepal (CHAIN et al., 2006) mostrou que esta bactéria sofreu grande fluxo gênico, através da aquisição de genes de outras bactérias e vírus, sugerindo uma grande mobilidade nas seqüências, resultado de rearranjos genômicos, como translocações e inversões.

Devido ao tamanho do genoma da *Y. pestis* ser considerado relativamente pequeno, a aquisição de genes, pode ser equilibrado pela perda de atividades de outros genes (pseudogenes), encontrados com alta freqüência no genoma das cepas de *Y. pestis* já seqüenciadas (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004).

As chamadas seqüências de inserção (IS's) são encontradas em múltiplas cópias no genoma da *Y. pestis*; IS100, IS285, IS1661, IS1541, tanto no cromossomo como nos três plasmídeos (DENG et al., 2002; SONG et al., 2004). Essas seqüências são pequenos segmentos de DNA bacteriano (<2,5 Kb) que podem se transferir de uma região para outra do genoma, deixando ou não uma cópia no local onde estavam no genoma. A transposição pode ser para o cromossomo ou para um plasmídeo, causando inserções, deleções e recombinações, resultando em mutações, inativação de genes, bloqueio ou inativação do controle da expressão gênica (HUANG et al., 2002; MAHILLON; CHANDLER, 1998; MOTIN et al., 2002).

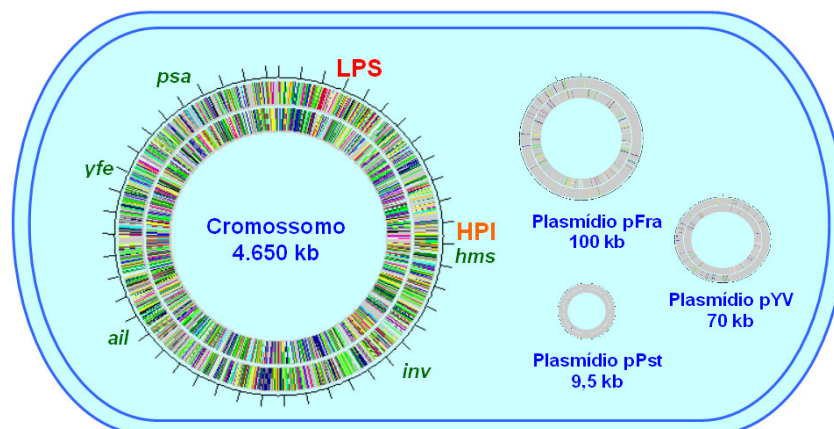


Figura 5: Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Y. pestis*.

Fonte: Cedido por Leal – Balbino, TC.

No genoma da *Y. pestis* também existem as seqüências de DNAs repetitivos, os chamados VNTRs (Número Variável de Repetições em Tandem). Com o sequenciamento dos genomas bacterianos foi revelado um alto percentual de VNTRs. Essas seqüências variam em tamanho, localização, complexidade e modo de repetição, são estáveis e polimórficas e podem estar agrupadas ou dispersas no genoma. Dependendo da localização dos VNTRs no genoma bacteriano, podem ocorrer alterações acarretando perda de funções gênicas, o que repercutirá na patogenicidade da bactéria e na adaptação do patógeno ao hospedeiro (LINDSTEDT, 2005).

2.9.1 O cromossomo da *Yersinia pestis*

O genoma da *Y. pestis* tem aproximadamente 4.650 kb com um conteúdo médio de GC de 47,46% (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004). Foram identificados no cromossomo da *Y. pestis* numerosos genes estruturais e reguladores que codificam para funções relacionadas ao metabolismo e patogenicidade assim como alguns genes inativos.

No cromossomo há uma região de 102 kb dividida em dois segmentos físicos e funcionalmente distintos: um relacionado à captação de ferro mediado por um sideróforo (yersiniabactina), localizado na HPI (ilha de patogenicidade), composto de 11 genes organizados em quatro operons (CARNIEL, 2001). E outro segmento relacionado à transmissão da *Y. pestis* pela pulga (HINNEBUSCH et al., 1996).

2.9.2 Os plasmídeos da *Yersinia pestis*

Nos diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil, foram encontradas cepas atípicas faltando algum plasmídeo ou contendo plasmídeos adicionais (FILIPPOV et al., 1990; LEAL et al., 1997; 2000). Também já foram relatados casos de cepas de alguns focos de peste que apresentaram plasmídeos crípticos com a aquisição de genes de resistência (GUIYOULE et al., 2001; PERRY; FERTHERSTON, 1997).

Os diversos tipos de manipulações em laboratórios como: repiques sucessivos, incubação ou estocagem em diferentes temperaturas, podem ocasionar alterações na virulência das culturas pela perda dos plasmídeos de virulência, de regiões do cromossomo ou mutações pontuais nos genes de virulência (LEAL et al., 1997; 2000; LEAL-BALBINO, 2004; 2006).

2.9.2.1 Plasmídeo pYV ou pCD1

O plasmídeo pYV de aproximadamente 70kb, é indispensável a virulência e está presente nas três espécies patogênicas de *Yersinia*. Este plasmídeo contém uma região de dependência ao cálcio (*lcrV*) para crescimento a 37°C. Fora dessa região estão localizados vários genes que codificam para um sistema de secreção tipo III que permitem a sobrevivência e multiplicação das bactérias nos tecidos linfóides dos hospedeiros (CORNELIS, 2000). Este plasmídeo contém seqüências de inserção (IS100 e IS285) que estão dispersas ao longo da sua molécula (HU et al., 1998).

2.9.2.2 Plasmídeo pPst ou pCP1

O plasmídeo pPst de cerca de 9,5kb, é específico de *Y. pestis* e parece ser responsável pelas proteínas implicadas no bloqueio do trato digestivo das pulgas e na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro a partir do sítio da picada (HINNEBUSH et al., 1996). Neste plasmídeo estão presentes os genes que codificam a pesticina (*pst*), uma proteína de imunidade a pesticina (*pim*) e um ativador do plasminogênio (*pla*) (SODEINDE; GOGUEN, 1988; SODEINDE et al., 1988). Este plasmídeo possui uma única cópia do elemento de inserção IS100 (HU et al., 1998).

2.9.2.3 Plasmídeo pFra ou pMT1

O plasmídeo pFra (90 – 110kb) codifica uma proteína capsular ou fração F1 que desempenha uma atividade antifagocítica (DU et al., 2002) e a toxina murina, Ymt, que parece estar envolvida na transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSH, 2002). A F1 é imunogênica para o homem e outros mamíferos e é largamente utilizada nos testes de diagnóstico da peste, seja pela pesquisa de anticorpos anti-F1 ou pela identificação do gene estrutural da F1, o *caf I* (CHU, 2000). Este plasmídeo possui uma cópia do elemento de inserção IS200, duas cópias do IS100 e uma cópia do IS285 (LINDLER et al., 1998).

2.10 Epidemiologia Molecular

Para a epidemiologia é de grande importância determinar a origem dos organismos envolvidos em uma doença. A identificação exata do patógeno é indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção da doença, e também para monitorar sua dispersão na população estudada. A epidemiologia molecular baseia-se na identificação e comparação da estrutura genética e os dados epidemiológicos dos isolados bacterianos permitindo estabelecer correlação entre eles e elaborar estratégias efetivas de controle epidemiológico (TENOVER et al., 1995).

A tipagem de bactérias patogênicas é realizada por diversos métodos que diferem quanto ao poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação (LINDSTEDT, 2005). Determinar o poder discriminatório de um método de tipagem é importante, devido a alguns métodos agruparem organismos dentro de poucos grupos, enquanto outros dividirem as coleções dos isolados relacionados epidemiologicamente. Diante disso, existe uma necessidade de se estabelecer um método de tipagem apropriado para diferenciar os isolados bacterianos dentro da população estudada (TENOVER et al., 1995). Atualmente existem numerosos métodos de tipagem molecular com capacidade discriminatória diferente.

A identificação e comparação de isolados bacterianos pode ser realizada por diferentes técnicas moleculares. Algumas delas utilizam a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e suas variações, como RAPD, PCR-Ribotipagem, PCR-IS, MLVA, etc. Estas técnicas são importantes

para a detecção de rearranjos de algumas regiões do genoma, monitoramento e distribuição dos patógenos (LEAL et al., 1999; HUANG et al., 2002; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2002).

A técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) é relativamente simples, pois não necessita conhecimento prévio da seqüência da bactéria e mostra o perfil do genoma todo incluindo seqüências plasmidiais. No entanto, é uma técnica de difícil reprodutibilidade, sofrendo interferência da qualidade e quantidade do DNA, variação do modelo do termociclador, da marca e até do lote da enzima utilizada nas reações (LEAL et al., 2004). Apesar disto, estudos de RAPD com cepas de *Y. pestis* brasileiras revelaram um padrão homogêneo para as cepas de diversos focos (LEAL, 1998).

A PCR-ribotipagem é baseada na amplificação da região espaçadora intergênica dos genes ribossomais que codificam o rRNA 16S ou 23S. Esta região codifica vários tRNA o que permite mostrar a diferença entre as bactérias. Para esta técnica são usados *primers* que anelam na região conservada do 16S e do 23S, gerando perfis que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos. Os genes ribossomais são úteis na detecção do polimorfismo genético entre diferentes bactérias. Existem de 2 a 11 cópias do gene rRNA por célula bacteriana (KOSTMAN et al., 1992). Entretanto, estudos da PCR-ribotipagem com *Y. pestis* do Brasil revelaram um padrão homogêneo para as cepas de diversos focos (SOBREIRA, 2002).

As IS's também são utilizadas nos estudos de tipagem molecular devido a capacidade de se inserir em múltiplos sítios de uma molécula alvo participando de rearranjos cromossômicos causando inserções, deleções e recombinações, podendo desta forma diferenciar os isolados. Esses marcadores genéticos são utilizados para tipagem de cepas de *Y. pestis* em estudos epidemiológicos (HUANG et al., 2002; MOTIN et al., 2002).

Alguns grupos têm utilizado o VNTR – Número Variável de Repetições em Tandem, como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas (LE FLÈCHE et al., 2001; DE BENITO et al., 2004). Estudos dos VNTRs são realizados pelo MLVA (Análise dos VNTRs através da técnica da PCR). O MLVA baseia-se na identificação do polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados, como resultados dos eventos de inserção e deleção dentro do VNTR (DE BENITO et al., 2004; LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004). Esta técnica é utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos, especialmente por identificar polimorfismo no genoma de espécies bacterianas que são geneticamente homogêneas quando analisadas por outras técnicas moleculares (VAN BELKUM, 1999).

Os VNTRs ou regiões repetitivas (Figura 6) sofrem frequentemente mutações resultando, na maioria das vezes, em alterações no número de repetições. Essas mutações ocorrem durante a replicação do DNA e podem surgir em combinação com falhas durante o mecanismo de reparo (STRAND et al., 1993). Dependendo da localização destes VNTRs no genoma da bactéria podem ocorrer alterações modificando a expressão gênica e conseqüentemente alterando a seqüência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica interferindo, portanto, na patogenicidade da bactéria e na adaptação do patógeno ao hospedeiro (ADAIR et al., 2000).

Os VNTRs variam em tamanho, localização e complexidade (VAN BELKUM et al., 1998). Quanto ao tamanho, podem ser classificados como mini ou microssatélites. Os microssatélites correspondem a unidades repetidas que variam de um a cinco pares de base e os minissatélites apresentam mais de seis pares de bases. Esses VNTRs podem ser encontrados em tandem ou dispersos no genoma (JEFFREYS et al., 1985).

Os DNAs repetitivos ainda podem ser classificados como: homopolimérico simples constituído de um único tipo de nucleotídeo (poli A, poli G, poli C, poli T) ou ainda de números grandes ou pequenos de várias classes multiméricas de repetições. Estas repetições são constituídas de unidades idênticas (repetições homogêneas), unidades mistas (repetições heterogêneas) ou repetições degenerativas (VAN BELKUM, 1998).

O MLVA mostrou-se como uma boa ferramenta para estudos epidemiológicos e filogenéticos em espécies bacterianas por revelar quantitativamente as similaridades e diferenças entre isolados (RORING et al., 2002). Dentre as diferentes espécies bacterianas analisadas com o MLVA destacam-se: *Y. pestis* de outros focos (ADAIR et al., 2000; LE FLÉCHE et al., 2001; KLEVYTSKA et al., 2001; POURCEL et al., 2004), *Y. enterocolitica* (DE BENITO et al., 2004), *Bacillus anthracis* (KEIM et al., 2000), *Haemophilus influenzae* (VAN BELKUM et al., 1997), *Enterococcus faecalis* (TITZE-DE-ALMEIDA, 2004), *Mycoplasma genitalium* (RORING et al., 2002) e *Francisella tularensis* (FARLOW et al., 2001).

Em *Y. pestis*, o estudo da variação no número de repetições de alguns *loci* VNTRs auxiliou nos estudos de tipagem (ADAIR et al., 2000; KLEVYTSKA et al., 2001) e epidemiologia molecular dessa espécie permitindo identificar os clones de *Y. pestis* circulantes em uma determinada área geográfica (GIRARD et al., 2004; LOWELL et al., 2005).

No Brasil, estudos de tipagem molecular utilizando diferentes técnicas: RAPD (LEAL, 1998), PCR-ribotipagem (SOBREIRA, 2002), PFGE (BARROS, 2007) demonstraram na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes,

ano e local de isolamento. Recentemente uma análise de algumas cepas isoladas no Nordeste do Brasil pelo MLVA revelou que elas apresentavam diversidade genética (ARAÚJO, 2005, 2007; OLIVEIRA, 2006; VALDEVINO NETO, 2006).

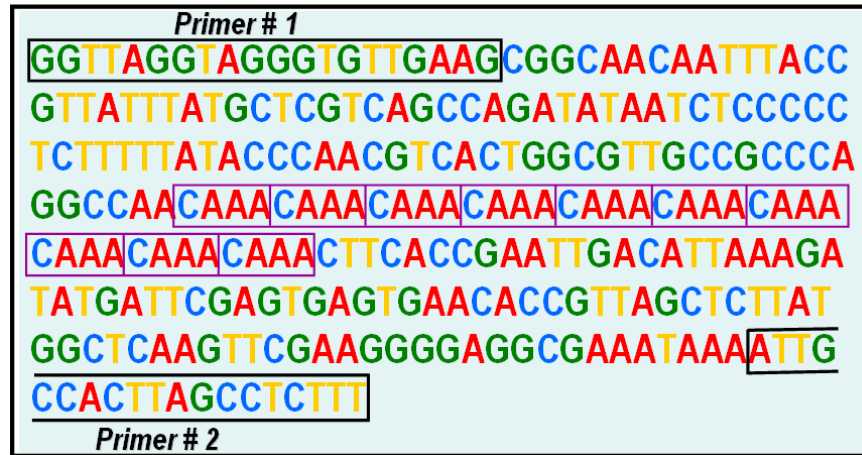


Figura 6: Esquema representativo do VNTR tetranucleotídeo CAAA.

Fonte: Baseado em Adair et al., 2000.

3 JUSTIFICATIVA

A peste, no mundo contemporâneo, pode ser considerada uma doença rara e, portanto, pouco conhecida, mesmo sendo atualmente classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença reemergente. O seu potencial epidêmico não pode ser negligenciado e o Brasil possui focos onde é mantida como enzootia de roedores silvestres-comensais, ocasionalmente atingindo o homem, podendo determinar sérias conseqüências médicas e sócio-econômicas ao país, o que a torna um problema atual e merecedor de atenção (ALMEIDA et al. 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

A peste ainda continua sendo uma ameaça em várias áreas do mundo: América do Norte, no oeste dos EUA, América do Sul, no Brasil, Equador, Peru e Bolívia; África, principalmente em Madagascar; Ásia, na China, Laos, Myanmar, Vietnã e Índia e sudeste da Europa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Em 2003, ocorreram 2.118 casos de peste em nove países sendo 182 fatais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004). No Brasil, em 1997, ocorreu um caso humano em Ipu-Ceará e em 2005 houve outro caso humano curado também no Ceará, o que reforça a importância de manter a vigilância nos focos (CDTV/CGDT/SVS/MS).

O Departamento de Microbiologia do CPqAM/Fiocruz desenvolveu diferentes estudos com as cepas isoladas nos focos do Nordeste do Brasil. Os métodos PCR-ribotipagem (SOBREIRA, 2002) e RAPD-PCR (LEAL, 1998) empregados no estudo destas cepas demonstraram uma homogeneidade, padrões genômicos idênticos entre cepas de diferentes características epidemiológicas, diferentes fontes, ano e local de isolamento. O PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) em cepas do surto da Paraíba indicou uma baixa variabilidade genética (BARROS, 2007).

O MLVA é uma técnica que tem sido padronizada pelo laboratório de Microbiologia do CPqAM e que vem mostrando poder discriminatório entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* (ARAÚJO, 2005, 2007; OLIVEIRA, 2006; VALDEVINO NETO, 2006). Os resultados obtidos demonstraram diversidade genética intra-específica nas cepas estudadas e relação com algumas características epidemiológicas. No entanto, ainda é necessário um maior aprimoramento da técnica e de sua análise para sua aplicação e correlação com os dados epidemiológicos e assim esclarecer se existe diversidade entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* e estabelecer um marcador molecular eficiente para a tipagem das cepas de *Y. pestis*.

A obtenção de marcadores capazes de diferenciar cepas provenientes de diversos focos, disseminados em numerosos países, tem interesse epidemiológico, pois poderá identificar os clones de *Y. pestis* existentes no Brasil e detectar o surgimento de um novo clone ou a introdução de uma nova cepa. Com um sistema de tipagem adequado será possível planejar e implementar novas medidas de controle nas áreas de foco de peste do Brasil.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe relação ou diversidade genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas em diferentes períodos, hospedeiros e municípios dos três focos de peste do estado de PE?

5 HIPÓTESE

- A. Existe relação genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes eventos epidemiológicos dos três focos de peste do estado de PE.
- B. O MLVA permite demonstrar a relação genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes eventos epidemiológicos dos três focos de peste do estado de PE.
- C. O MLVA é um marcador molecular eficaz no estudo intraespecífico do gênero *Yersinia*.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral:

- Realizar tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* isoladas no Nordeste do Brasil pela análise do número variável de repetições em tandem (MLVA).

6.2 Específicos:

- A. Analisar os padrões de tipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis* pela análise dos locos VNTRs (MLVA), estabelecendo a relação genética entre as cepas e os dados epidemiológicos;
- B. Avaliar a aplicação de diferentes locos VNTRs para tipagem molecular das cepas de *Y. pestis*;
- C. Verificar a eficácia do MLVA como marcador molecular na análise das cepas brasileiras de *Y. pestis*.
- D. Comparar o perfil genotípico encontrado nas cepas de *Y. pestis* com as cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* para estabelecer a relação entre essas espécies e avaliar o MLVA como marcador molecular.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Cepas Estudadas

Foram analisadas 63 cepas de *Y. pestis* estocadas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste (SRP) – Laboratório de nível de segurança 3 (NB3) do CPqAM. Das 63 cepas 43 foram isoladas em diferentes períodos (1966 a 1980), diferentes hospedeiros (humanos, roedores e pulgas) e de diversos municípios dos três focos de peste do estado de PE (Tabela 1). As outras 20 cepas são provenientes de roedores e pulgas que foram isoladas durante uma epizootia que ocorreu em agosto de 1967 no sítio de Alagoinha, uma propriedade localizada na Chapada do Araripe no estado de Pernambuco (Tabela 2) (ALMEIDA et al., 1985).

As cepas foram identificadas por P (Peste), Exu (isoladas do Plano Piloto de Peste em Exu) segundo número de ordem dos isolados (ALMEIDA et al., 1985). Em relação às cepas da epizootia foram realizados dois cultivos subsequentes em diferentes períodos em substituição as culturas originais. Neste trabalho, os subcultivos foram identificados como 1S e 2S referentes ao 1º e 2º subcultivos respectivamente (Tabela 2).

Também foi incluído no estudo oito cepas de *Y. pestis* isoladas em outros países (EUA, Madagascar, Iran, Birmânia, Curdistão e Peru) (Tabela 3), assim como cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* e nove de *Y. enterocolitica* para análise genética comparativa com o marcador molecular MLVA (Tabela 4).

7.2 Bactérias e Condições de Cultivo

As cepas mantidas na coleção de culturas estão acondicionadas em camada alta do meio Blood Agar Base (BAB, Difco) sob refrigeração a 4°C. Para os estudos as culturas foram renovadas por repique em caldo BHI (Brain Heart Infusion broth, Difco) e incubadas a 28°C por 48 horas. As colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI para extração do DNA genômico.

Cada cultura crescida foi plaqueada em duas placas de BAB (Blood Agar Base, Difco), uma para teste com o bacteriófago antipestoso para a confirmação da identificação e pureza do cultivo, incubadas a 28°C e inspecionadas diariamente por até cinco dias para a visualização da lise pelo fago e observação da morfologia das colônias desenvolvidas. A outra placa foi usada para reativação das colônias em BHI caso seja comprovada a pureza deste isolado na placa com o fago antipestoso.

7.3 Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA genômico das cepas de *Y. pestis* estudadas foram utilizados dois protocolos. Um deles o DNA genômico das culturas foi extraído baseado no protocolo de lise por aquecimento desenvolvido por KEIM et al (2000) para *Bacillus anthracis* e adaptado para *Y. pestis* no Departamento de Microbiologia – CPqAM. A lise bacteriana foi realizada por fervura a partir de uma colônia isolada em BAB e ressuspensa em 200µL de TE (Tris – EDTA, pH 7.0), fervida por 20 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 1min. O sobrenadante, contendo o material genético, foi usado para as reações do MLVA.

O outro protocolo foi realizado como descrito em SOUZA et al (2007). Foi utilizado um mililitro da cultura em BHI que foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 500µl de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado homogeneizado com 500µl de TE, 10µl de lisozima (10mg/ml) e 10µl de proteinase K (5mg/ml). A suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos seguido da adição de 100µl de STE (SDS 2,5%, Tris-HCl 10nM pH8,0; EDTA 0,25M), 15 minutos de incubação a 60°C, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130µl de acetato de amônio 7,5M, mantida no banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos. Aproximadamente 700µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol a -70°C por 30 minutos ou a -20°C por 24 horas seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspensa em 10µl de água mili Q e conservado a -20°C. A qualidade do DNA obtido foi

avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V usando tampão TBE (Tris-borato 0,089 M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V. A visualização do DNA foi observado sob luz UV após coloração em solução de brometo de etídio (15mg/ml). A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *HindIII* usando o programa 1D Image Analysis, versão 3.5 (Kodak Digital Science).

7.4 Tipagem molecular pela análise dos múltiplos locos VNTR (MLVA)

Foram selecionados 11 locos VNTRs com base na amplificação por PCR que apresentaram um alto potencial para polimorfismo revelados em trabalhos descritos na literatura: ms04, ms05, ms06, ms 07, ms09, ms20, ms30, ms45, ms46, ms54 e ms 62 (LE FLÈCHE et al., 2001) (Tabela 5).

Os ensaios de PCR foram realizados para um volume final de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA, 20pmol de cada *primer*, tampão (pH8) 50mM, desoxinucleotídeo trifosfato 0,16mM (dNTP-Invitrogen, Brasil), 1,5mM MgCl₂, 1U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil).

Em todas as reações de PCR o termociclador (Biometra) foi programado para 96°C por 5 minutos para desnaturação, seguida de 34 ciclos de 96°C por 20 segundos para anelamento dos *primers*, 60°C por 30 segundos e a 65°C por 1 minuto para síntese, terminando com 65°C por 5 minutos para alongamento das fitas do DNA.

Os produtos de amplificação da PCR (*amplicons*) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA sob voltagem de 100V, por cerca de três horas, corados com brometo de etídeo (1µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e digitalizados em câmera Kodak® para posterior análise. Foi utilizado como padrão de massa molecular o “50 ou 100 base-pair DNA ladder” (Invitrogen, Brasil) dependendo do tamanho da unidade repetitiva.

7.5 Análise dos Dados obtidos pelo MLVA

7.5.1 Determinação do Número de Repetições

O tamanho dos *amplicons* foi determinado através do programa 1D Image Analysis software, versão 3.5 da Kodak Digital Science. O número das repetições de cada *amplicon* foi calculado usando a fórmula deduzida, segundo Adair et al. (2000):

$$\text{Número de repetições} = \frac{\text{Tamanho do } \textit{amplicon} \text{ (pb)} - \text{Região flanqueadora dos repeats (pb)}}{\text{Tamanho da repetição das unidades repetitivas (pb)}}$$

O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi determinado pelo coeficiente de Hamming (1950) e o agrupamento dos perfis genotípico das cepas foi analisado pela construção de dendrogramas através do algoritmo UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1962) usando o programa MEGA, version 4.0 (KUMAR et al. 2008).

Para verificar a localização dos VNTRs no genoma completo de cepas de *Y. pestis* previamente seqüenciados, foram realizadas análises *in silico* utilizando o programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Toll* (ALTSCHUL et al., 1997).

7.5.2 Análise discriminatória dos locos VNTRs

O poder discriminatório para o método de tipagem molecular MLVA e pela análise de cada VNTR estudado, foi determinado de acordo com o índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988). O valor *D* indica a probabilidade em que dois isolados, aleatoriamente selecionados dentro da população testada, serão classificados em diferentes tipos. A seguinte fórmula foi utilizada:

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

onde D = índice discriminatório, s = número total dos tipos diferentes, n_j = número de isolados representando cada tipo e N = número total de isolados na amostra populacional.

8 RESULTADOS

8.1 Tipagem Molecular pelo MLVA (Análise dos VNTRs)

8.1.1 Análise das cepas de *Y. pestis* isoladas nos três focos de peste do estado de PE e de focos de outros países

As 51 cepas de *Y. pestis* estudadas (43 cepas de *Y. pestis* brasileiras e oito cepas de *Y. pestis* estrangeiras) pertencentes a bacterioteca do SRP do CPqAM amplificaram os onze locos VNTRs analisados (ms04, ms05, ms06, ms07, ms09, ms20, ms30, ms45, ms46, ms54 e ms62). Entre os onze VNTRs investigados, dois (ms54 e ms30) revelaram – se monomórficos demonstrando o mesmo tamanho de *amplicons* e consequentemente o mesmo número de cópias das unidades repetitivas (UR) para as cepas de *Y. pestis* isoladas nos três focos de peste do estado de PE. Quando os mesmos VNTRs foram comparados com as cepas de *Y. pestis* estrangeiras, também apresentam-se monomórficos. O VNTR ms54 gerou sete unidades repetitivas (7UR) referentes ao *amplicon* de aproximadamente 270 pb e o VNTR ms30 gerou 2UR referentes a um *amplicon* de 690 pb em todas as cepas de *Y. pestis* analisadas (Figuras 7 A – B e 10). Os demais VNTRs analisados revelaram-se polimórficos, diferindo entre as cepas de *Y. pestis* pelo tamanho do *amplicon* e no número de cópias das unidades repetitivas, gerando de dois a oito alelos para as cepas de *Y. pestis* dos três focos de peste do estado de PE e estrangeiras (Figura 11).

O VNTR ms06 gerou seis alelos diferentes entre as cepas de *Y. pestis* brasileiras e estrangeiras, com 2, 4, 5, 7, 8 e 9 UR referentes respectivamente aos *amplicons* de 245, 365, 425, 545, 605 e 665 pb. Apenas duas cepas brasileiras de *Y. pestis* obtiveram perfis exclusivos; a P. Exu 387 gerou 5UR referente a um *amplicon* de 425pb, assim como a cepa P. Exu 340 que obteve 7UR referente ao *amplicon* de 545 pb. A cepa brasileira de *Y. pestis* P. Exu 16 apresentou o mesmo número de unidades repetitivas (4UR) que as cepas estrangeiras Kim e PKR684 (Figuras 8 A – B, 10 e 11).

O VNTR ms09 gerou três alelos com 20, 23 e 28 UR referentes a 496, 550, e 700 pb respectivamente entre as cepas de *Y. pestis* estudadas. Apenas a cepa P. Exu 16 apresentou 23UR referente ao fragmento de 550 pb e duas cepas estrangeiras (Kim e PKR 684) apresentaram

20UR (496 pb). Todas as outras cepas brasileiras e estrangeiras geraram 28UR (Figuras 8C, 10 e 11).

O VNTR ms46 gerou quatro alelos de 7, 10, 18 e 26 UR referentes a 250, 271, 327 e 383 pb respectivamente nas cepas de *Y. pestis* brasileiras e estrangeiras. A análise deste VNTR demonstrou que apenas a cepa estrangeira PKR 684 apresentou 18UR referente ao *amplicon* de 327 pb diferente de todas as cepas estrangeiras e brasileiras de *Y. pestis* analisadas com este VNTR. A cepa P. Exu 16 apresentou o mesmo número de unidades repetitivas que a cepa estrangeira Kim (26UR), enquanto que as demais cepas foram distribuídas entre os diferentes alelos observados (Figuras 8D, 10 e 11).

O VNTR ms62 revelou-se o mais polimórfico dos marcadores moleculares analisados entre as cepas de *Y. pestis* estudadas, gerando oito alelos com 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 12 UR referentes a 197, 206, 215, 224, 233, 251, 260 e 278 pb respectivamente. Dos oito alelos gerados, quatro foram exclusivos para as cepas estrangeiras; EV 76, PKOL, PB8, PBM5, PKR 684 e Alex que obtiveram 3, 7, 10 e 12 UR correspondentes a 197, 233, 260 e 278 pb (Figuras 8E, 10 e 11). As cepas brasileiras obtiveram apenas três alelos com 4, 5 e 6UR. A cepa brasileira P. Exu 16 obteve o mesmo número de unidades repetitivas que a cepa estrangeira Kim com 9UR (Figura 10).

O VNTR ms07 também revelou – se bastante polimórfico, gerando sete alelos com 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 UR referentes a 296, 306, 316, 326, 336, 346 e 356 pb respectivamente. Neste VNTR o único fragmento de amplificação exclusivo foi referente a cepa estrangeira Kim que gerou 6UR referente a um *amplicon* de 296 pb (Figuras 8F, 10 e 11). Todas as outras cepas estrangeiras estudadas apresentaram o mesmo número de unidades repetitivas (7UR), além disso a cepa brasileira P. Exu 16 apresentou o perfil idêntico as cepas estrangeiras com 7UR. As demais cepas brasileiras obtiveram perfil próprio de 8, 9, 10, 11 e 12UR (Figura 10).

O VNTR ms45 gerou apenas um alelo de 3UR referente a 231 pb entre as cepas brasileiras e estrangeiras de *Y. pestis* (Figuras 10 e 11). Exceto para uma cepa brasileira P. Exu 16 e duas estrangeiras Kim e PKR684 que apresentaram perfil exclusivo de 2UR referente a 219 pb (Figuras 8G, 10 e 11).

O VNTR ms20 gerou quatro alelos de 2, 3, 4 e 5 UR referentes a 248, 263, 278 e 293 pb respectivamente de maneira que os *amplicons* variaram entre as cepas de *Y. pestis* analisadas, mas com predominância do perfil de 4UR (Figuras 9A e 11). No entanto, as cepas brasileiras de *Y. pestis* obtiveram 4 e 5UR, enquanto que as estrangeiras 2 e 3UR. Apenas a cepa brasileira P. Exu 16 apresentou perfil idêntico com algumas cepas estrangeiras (Figura 10).

O VNTR ms04 gerou quatro alelos com 4, 6, 7 e 8UR referentes a 328, 362, 379 e 396 pb entre as cepas de *Y. pestis* brasileiras e estrangeiras analisadas (Figuras 9B e 11). Apenas duas cepas estrangeiras PKR 684 e Kim obtiveram perfil exclusivo com 4UR (Figura 10). As demais cepas analisadas foram distribuídas entre os alelos de 6, 7 e 8UR (Figura 10).

O VNTR ms05 gerou três alelos com 6, 7 e 8UR referentes aos *amplicons* de 267, 284 e 301 pb respectivamente nas cepas de *Y. pestis* analisadas. Todas as cepas brasileiras obtiveram o mesmo número de repetições 7UR, exceto a P. Exu 16 que apresentou o mesmo perfil de 6UR das estrangeiras Kim e PKR 684. As cepas estrangeiras obtiveram 6, 7 e 8UR, no entanto, apenas uma cepa estrangeira P. Peru gerou 8UR diferente de todas as demais cepas brasileiras e estrangeiras analisadas com este VNTR (Figuras 9C, 10 e 11).

Com base nos padrões de amplificação obtidos com os onze VNTRs pela técnica do MLVA, as 51 cepas de *Y. pestis* (brasileiras e estrangeiras) foram distribuídas em 35 perfis genotípicos denominados neste trabalho de P1 a P35 (Tabelas 1 e 3; Figura 10).

A análise das cepas de *Y. pestis* de acordo com o coeficiente de Hamming (1950) e da construção do dendrograma através do algoritmo UPGMA pode ser visto na figura 10. De acordo com o dendrograma as cepas de *Y. pestis* estudadas foram agrupadas em três cladogramas (I, II e IV). O primeiro clado (I) agrupou todas as 42 cepas brasileiras de *Y. pestis*, exceto uma (P. Exu 16) que ficou agrupada no clado IV juntamente com duas cepas de *Y. pestis* estrangeiras; Kim e PKR684 (Figura 10). As cepas de *Y. pestis* estrangeiras foram agrupadas em dois cladogramas separados o II e IV. As cepas brasileiras de *Y. pestis* foram distribuídas em 27 perfis genotípicos P1 a P27 (Tabela 1; Figura 10) e as estrangeiras foram distribuídas em oito perfis genotípicos P28 a P35 (Tabela 3; Figura 10).

De acordo com o índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988) o poder discriminatório com os 11 VNTRs analisados nas cepas de *Y. pestis* isoladas em um único foco foi de 0,95. O índice discriminatório foi calculado também individualmente para cada VNTR analisado neste estudo nas cepas brasileiras de *Y. pestis*. Para o VNTR ms06 o índice foi de 0,44; VNTR ms 09 foi 0,05; VNTR ms46 foi 0,38; VNTR ms62 foi 0,26; VNTR ms07 foi 0,68; para o VNTR ms20 foi 0,14 e para o VNTR ms54, VNTR ms 30 e VNTR ms45 foi 0 (zero);

A localização dos VNTRs no genoma das cepas de *Y. pestis* previamente seqüenciadas foi realizada pela análise *in silico* utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). A ferramenta indicou que dos onze locos VNTRs estudados dez foram localizados no DNA cromossomal da bactéria, enquanto apenas um, o VNTR ms09, foi localizado no plasmídeo de virulência (pYV) de *Y. pestis* (Tabela 5).

8.1.2 Análise das cepas de *Y. pestis* isoladas durante uma epizootia de peste em 1967 no foco da Chapada do Araripe – PE.

As 20 cepas de *Y. pestis* estocadas na bacterioteca do SRP do CPqAM estavam armazenadas em dois subcultivos (duas culturas por cepa). Estes subcultivos foram referentes a repiques subseqüentes realizados em diversos anos. Os diferentes repiques levaram a tentativa de recuperação das 40 culturas, após sete dias de crescimento em meio BAB a 28°C. Dessas apenas 22 foram recuperadas, sendo seis do primeiro subcultivo e 16 do segundo. Em apenas duas cepas foi possível recuperar os dois subcultivos das culturas pareadas (P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S (Tabela 2).

Todos os 11 locos VNTRs analisados foram amplificados nas culturas de *Y. pestis* isoladas durante a epizootia de Peste. Desses, dez se revelaram monomórficos, apresentando o mesmo tamanho do *amplicon* e o mesmo número de unidades repetitivas: VNTR ms09 28UR referentes a 700pb; 250 pb com 7UR para o VNTR ms46; 270 pb com 7UR para o VNTR ms54; 690 pb com 2UR para o VNTR ms30; 206 pb com 4UR para o VNTR ms62; 306 pb com 7UR para o VNTR ms07; 231 pb com 3UR para o VNTR ms45; 293 pb com 5UR para o VNTR ms20; 379 pb com 7UR para o VNTR ms04 e 284 pb com 8UR para o VNTR ms05 (Figura 12 A – I). Apenas o VNTR ms06 revelou-se polimórfico, gerando três alelos com 8, 9 e 10 UR referentes a 605, 665 e 725 pb respectivamente (Figura 12 J; Tabela 2).

O alelo de 605 pb foi encontrado em 17 culturas, cinco do primeiro subcultivo e em doze do segundo; o alelo de 665 pb foi observado em três culturas, uma do primeiro subcultivo e duas do segundo e para o alelo de 725 pb apenas duas culturas do segundo subcultivo foram verificadas (Tabela 2). As culturas pareadas das duas cepas (P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S) demonstraram para este VNTR 8UR referentes a 605 pb (Tabela 2).

8.1.3 Análise das cepas de *Y. pseudotuberculosis*

Cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* foram analisadas com os 11 locos VNTRs estudados juntamente com as cepas de *Y. pestis*, para avaliar o poder discriminatório intraespecífico da técnica do MLVA.

Todos os 11 locos VNTRs foram amplificados também nas cepas de *Y. pseudotuberculosis*, com exceção da cepa IP 31553 que não amplificou o VNTR ms45 e a cepa IP 32952 que não amplificou para o VNTR ms30. Os tamanhos dos fragmentos amplificados com os onze locos VNTRs foram similares aos encontrados em cepas de *Y. pestis*, mas foram observados também alguns *amplicons* com tamanhos exclusivos para as cepas de *Y. pseudotuberculosis* (Tabela 4; Figura 10).

O VNTR ms09 foi o único que apresentou um padrão de amplificação monomórfico para as cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis*, gerando 28UR e um segmento de amplificação correspondente a 700 pb. Os demais locos apresentaram um elevado polimorfismo no número de repetições e tamanho dos fragmentos amplificados (Tabela 4; Figura 10).

Entre os locos polimórficos para as cepas de *Y. pseudotuberculosis* foi observado de um a cinco alelos. O VNTR ms06 obteve cinco alelos diferentes para cada cepa de *Y. pseudotuberculosis* estudada com 3, 7, 8, 14 e 17UR referentes a 305, 545, 605, 905, 1085pb. Para o VNTR ms46 foi observado três alelos entre as cepas de *Y. pseudotuberculosis* com 4, 7 e 8UR referentes a 229, 250 e 257 pb. Com o VNTR ms54 foram obtidos quatro alelos com 5, 6, 7 e 8UR referentes a 226, 248, 270 e 292pb. A análise do VNTR ms30 gerou quatro alelos com 1, 4, 6 e 8UR correspondentes a 636, 798, 906 e 1014 pb. O VNTR ms62 amplificou quatro alelos referentes a 4, 8, 16 e 26UR correspondendo respectivamente a 206, 242, 314 e 404pb. Com o VNTR ms07 foi observado três alelos com 4, 6, 9UR referentes aos *amplicons* de 276, 296 e 326 pb. Para o VNTR ms45 foram obtidos dois alelos com 1 e 4UR referentes a 207 e 243 pb. Com o VNTR ms20 foi observado dois alelos com 2 e 5UR correspondendo a 248 e 293 pb. Para o VNTR ms04 foram obtidos cinco alelos com 1, 2, 3, 5 e 6UR referentes aos *amplicons* de 277, 294, 311, 345 e 362 pb. O VNTR ms05 gerou três alelos com 1, 3 e 5UR referentes a 172, 216 e 250 pb (Tabela 4; Figura 11).

Com base no padrão de amplificação das cepas de *Y. pseudotuberculosis* foi possível agrupar as cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* em cinco perfis genotípicos distintos, denominados neste trabalho de P42 a P46 (Tabela 4). Apesar de não obter amplificação de dois VNTRs com duas cepas (IP31553 e IP32952) foi possível agrupá-las em perfis genotípicos próprios, pois os dados obtidos na análise dos outros VNTRs as enquadravam nos perfis genotípicos diferentes (P42 e P45) das demais cepas de *Y. pseudotuberculosis*, analisados pelo MLVA com os 11 locos VNTR (Tabela 4).

As três cepas de *Y. pseudotuberculosis* que amplificaram para os onze locos VNTRs foram incluídas na análise pelo dendrograma junto com as cepas de *Y. pestis* brasileiras e

estrangeiras e as cepas de *Y. enterocolitica*, como pode ser visualizado na figura 10. No dendrograma as três cepas de *Y. pseudotuberculosis* foram agrupadas em um único clado (V) separadas das outras espécies de *Yersinia*. As outras duas cepas de *Y. pseudotuberculosis* que não amplificaram para todos os VNTRs, apesar de terem sido agrupadas nos devidos perfis genotípicos, não foram incluídas no dendrograma pois a falta destes dados comprometeria a análise genotípica das cepas de *Yersinia*.

8.1.4 Análise das cepas de *Y. enterocolitica*

Nove cepas de *Y. enterocolitica* foram analisadas pelo marcador molecular MLVA para comparação com as cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* e avaliação do marcador. Os onze locos VNTRs foram amplificados nas nove cepas de *Y. enterocolitica*, com exceção da cepa Ye 37 analisada com o VNTR ms06, e das cepas Ye 43p e Ye 25L analisadas com o VNTR ms05, que não foi possível obter a amplificação desta regiões nestas cepas (Tabela 4).

Nas nove cepas de *Y. enterocolitica* analisadas com os onze locos VNTR, sete VNTRs apresentaram um padrão de amplificação monomórfico demonstrando apenas um *amplicon* e o mesmo número de unidades repetitivas para todas as cepas de *Y. enterocolitica* (Tabela 4). Estas cepas geraram 28 UR referente ao segmento de 700 pb com o VNTR ms09, 7 UR (250 pb) com o VNTR ms46, 7 UR (270 pb) com o VNTR ms54, 2 UR (690 pb) com o VNTR ms30, 3 UR (231 pb) com o VNTR ms45, 3 UR (263 pb) com VNTR ms20 e 7 UR (379 pb) com o VNTR ms04 (Tabela 4).

Apenas quatro locos VNTRs analisados apresentaram um padrão de amplificação polimórfico para as nove cepas de *Y. enterocolitica*, onde as cepas demonstraram tamanhos de *amplicons* e números de unidades repetitivas diferentes (Tabela 4). Nas cepas analisadas com o VNTR ms06 foi observado alelos com 8 UR referente a 605 pb e 9 UR referente a 665 pb. Com o VNTR ms62 foram observados alelos com 5UR referente ao segmento de 215 pb e com 6 UR referente ao *amplicon* de 224 pb. O VNTR ms07 gerou alelos com 8 UR referente ao segmento de 316 pb e 9 UR referente ao segmento de 326 pb. Por fim, após análise do VNTR ms05 foram observados alelos com 5 UR e 6 UR correspondentes aos segmentos de 250 pb e 267 pb respectivamente (Figura 11; Tabela 4).

Baseado no padrão de amplificação das cepas de *Y. enterocolitica* foi possível distribuir – las em seis perfis genotípicos diferentes, denominados neste trabalho de P36 a P41. Apesar da ausência de amplificação de dois VNTRs para três cepas de *Y. enterocolitica* ainda foi possível agrupar duas delas (Ye 37 e Ye 43) em dois perfis genotípicos (P36 e P41) pois os dados analisados com os outros VNTRs com estas cepas permitiram enquadrá-las em perfis genotípicos distintos. No entanto, não foi possível a genotipagem da cepa Ye 25L em um perfil genotípico já existente ou mesmo em um novo perfil, pois o VNTR ms05 não amplificado implicaria no direcionamento do perfil desta cepa, podendo ser agrupada no perfil genotípico P39 ou P40, ou ainda em um novo perfil genotípico (Tabela 4).

Da mesma forma como realizado com as cepas de *Y. pseudotuberculosis*, apenas os isolados de *Y. enterocolitica* que amplificaram para os onze locos VNTRs foram incluídos na análise pelo dendrograma. De acordo com o dendrograma as seis cepas de *Y. enterocolitica* possíveis de análise ficaram agrupadas em um único clado e distribuídas em quatro perfis genotípicos distintos P37 a P40 (Figura 10).

Tabela 1: Dados epidemiológicos das cepas de *Y. pestis* isoladas nos focos do Nordeste do Brasil e Perfis Genotípicos gerados neste estudo.

Cepa	Fonte	Foco	Município	Biovar	Ano de isolamento	PG
P. Exu 248	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Orientalis	1968	P1
P. Exu 249	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Orientalis	1968	P2
P. Exu 832	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaimbó-PE	Orientalis	1979	P3
P. Exu 827	Pulga (Pj)	Borborema	São Caetano-PE	Orientalis	1979	P4
P. Exu 16	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Orientalis	1966	P5
P. Exu 387	Roedor (N)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1970	P6
P. Exu 340	Humano	Araripe	Ipubi-PE	Orientalis	1969	P7
P. Exu 15	Humano	Araripe	Exu-PE	Orientalis	1966	P8
P. Exu 674	Humano	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	P9
P. Exu 769	Humano	Araripe	Ipubi-PE	Orientalis	1975	P10
P. Exu 720	Pulga (Pj)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	
P. Exu 602	Roedor (N)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	
P. Exu 718	Roedor (N)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	
P. Exu 715	Humano	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	P11
P. Exu 623	Roedor (Gs)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	
P. Exu 738	Humano	Araripe	Araripina-PE	Orientalis	1975	
P. Exu 845	Humano	Araripe	Ipubi - PE	Orientalis	1980	
P. Exu 363	Roedor (N)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1970	
P. Exu 365	Roedor (N)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1970	
P. Exu 793	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo - PE	Orientalis	1978	P12
P. Exu 798	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo - PE	Orientalis	1978	
P. Exu 813	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo - PE	Orientalis	1979	
P. Exu 822	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo - PE	Orientalis	1979	
P. Exu 17	Humano	Triunfo	Triunfo-PE	Orientalis	1966	P13
P. Exu 459	Pulga (Pj)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1971	P14
P. Exu 771	Humano	Araripe	Araripina-PE	Orientalis	1975	P15
P. Exu 825	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaimbó-PE	Orientalis	1979	
P. Exu 246	Humano	Araripe	Araripina-PE	Atípico	1968	
P. Exu 778	Humano	Araripe	Araripina-PE	Orientalis	1975	P16
P. Exu 781	Humano	Araripe	Granito - PE	Orientalis	1975	
P. Exu 373	Pulga (Pj)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1970	P17
P. Exu 430	Roedor (Os)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1971	P18
P. Exu 617	Pulga (Pj)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1974	P19
P. Exu 185	Humano	Borborema	Caruaru-PE	Orientalis	1967	P20
P. Exu 351	Humano	Triunfo	Triunfo-PE	Orientalis	1969	
P. Exu 292	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Orientalis	1968	P21
P. Exu 312	Humano	Araripe	Exu-PE	Orientalis	1969	P22
P. Exu 788	Pulga (Pj)	Araripe	Araripina-PE	Orientalis	1977	P23

P. Exu 384	Pulga (Pj)	Araripe	Exu-PE	Orientalis	1970	P24
P. Exu 787	Pulga (Pj)	Araripe	Exu - PE	Orientalis	1976	P25
P. Exu 791	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo - PE	Orientalis	1978	P26
P. Exu 334	Humano	Araripe	Exu-PE	Orientalis	1969	
P. Exu 276	Humano	Araripe	Bodocó - PE	Orientalis	1968	P27

* Pulga (Pj) – *Polygenis jordani*; Roedor: (N) – *Necromys*; (Os) – *Oryzomys subflavus*; (Gs) – *Galea spixii*. PG – Perfil Genotípico.

Tabela 2: Características das cepas de *Y. pestis* isoladas durante uma epizootia de Peste na Chapada do Araripe-PE, data de isolamento e procedência das cepas. Resultado da análise pelo MLVA com o VNTR ms06.

Cepas	Procedência	Data de isolamento (1967)	VNTR			
			1S	2S	ms06 (pb)	UR
P. Exu 30 2S	07 Pbj de 04 N	03/ago	*	26/05/1988	605	8
P. Exu 31 2S	<i>Necromys</i>	04/ago	*	26/05/1988	605	8
P. Exu 33 1S	<i>Necromys</i>	05/ago	10/01/1978	*	605	8
P. Exu 35 2S	01 Pbj de 01 N	06/ago	*	25/05/1988	605	8
P. Exu 36 2S	02 Pbj de 04 N	07/ago	*	08/06/1988	665	9
P. Exu 39 2S	<i>Necromys</i>	09/ago	*	08/06/1988	605	8
P. Exu 40 1S	<i>Necromys</i>	12/ago	15/05/1972	*	605	8
P. Exu 42 2S	<i>Necromys</i>	13/ago	*	08/06/1988	605	8
P. Exu 44 1S	05 Pbj de 10 N	14/ago	15/05/1972	*	665	9
P. Exu 47 2S	<i>Necromys</i>	16/ago	*	08/06/1988	605	8
P. Exu 48 2S	<i>Necromys</i>	16/ago	*	08/06/1988	605	8
P. Exu 51 1S	<i>Necromys</i>	18/ago	14/05/1972	*	605	8
P. Exu 53 2S	<i>Necromys</i>	19/ago	*	23/06/1988	605	8
P. Exu 54 2S	<i>Rattus rattus</i>	19/ago	*	23/06/1988	665	9
P. Exu 57 1S e 2S	<i>Necromys</i>	23/ago	14/05/1972	23/06/1988	605	8
P. Exu 59 2S	06 Pbj de 06 N	23/ago	*	23/06/1988	725	8
P. Exu 60 1S e 2S	<i>Rattus rattus</i>	23/ago	25/04/1972	23/06/1988	605	8
P. Exu 61 2S	<i>Necromys</i>	23/ago	*	23/06/1988	605	8
P. Exu 67 2S	<i>Necromys</i>	26/ago	*	28/07/1988	725	10
P. Exu 74 2S	03 Xc piso casa	27/ago	*	28/07/1988	605	8

Pulgas – Pbj = *Polygenis bolhsi jordani*; Xc = *Xenopsylla cheopis*. Roedor – N = *Necromys*; 1S = 1º Subcultivo; 2S = 2º Subcultivo. (*) Cepas que não apresentaram crescimento.

Tabela 3: Dados epidemiológicos e perfis genotípicos das cepas de *Y. pestis* isoladas em focos de outros países.

Cepa	Fonte	Foco	Biovar	Ano de isolamento	PG
PB8	s/i	Birmania	Orientalis	s/i	P28
Kim	Humano	Iran	Medievalis	s/i	P29
PKR 684	s/i	Iran	Medievalis	s/i	P30
EV 76	Humano	Madagascar	Orientalis	1926	P31
PBM5	s/i	Birmania	Orientalis	s/i	P32
PKOL	s/i	Curdistão	Orientalis	s/i	P33
P. Peru	Humano	Peru	Orientalis	1995	P34
Alex	Humano	EUA	Orientalis	s/i	P35

s/i: Sem informacao.

Tabela 4: Dados epidemiológicos das cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* estudadas com os 11 VNTRs analisados e os perfis genotípicos gerados.

Cepa	Fonte	Foco	Sorotipo	ms06/UR	ms09/UR	ms46/UR	ms54/UR	ms30/UR	ms62/UR	ms07/UR	ms45/UR	ms20/UR	ms04/UR	ms05/UR	P G
Ye 37	S	RJ	O:3	*	700/28	250/7	270/7	690/2	215/5	326/9	231/3	263/3	379/7	267/6	P36
Ye 25c	S	RJ	O:3	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	267/6	P37
Ye 40	S	RJ	O:3	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	267/6	P38
Ye 5a	S	RJ	O:3	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	215/5	316/8	231/3	263/3	379/7	267/6	P38
Ye 41	S	RJ	O:3	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	250/5	P39
Ye 102p	H	RJ	O:5	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	250/5	P39
Ye 124 p	H	RJ	O:4	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	267/6	P40
Ye 43 p	H	RJ	O:6	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	326/9	231/3	263/3	379/7	*	P41
Ye 25 L	S	RJ	O:3	665/9	700/28	250/7	270/7	690/2	224/6	316/8	231/3	263/3	379/7	*	-
IP 31553	R	s/i	VI	605/8	700/28	257/8	292/8	1014/8	242/8	296/6	*	248/2	362/6	172/1	P42
IP 32944	B	s/i	III	305/3	700/28	250/7	226/5	636/1	206/4	276/4	243/4	248/2	277/1	216/3	P43
IP 32950	H	s/i	I	545/7	700/28	229/4	270/7	906/6	404/26	276/4	207/1	248/2	345/5	216/3	P44
IP 32952	H	s/i	IV	905/14	700/28	257/8	248/6	*	206/4	326/9	243/4	248/2	311/3	250/5	P45
IP 32953	H	s/i	I	1085/17	700/28	250/7	270/7	798/4	314/16	276/4	207/1	293/5	294/2	216/3	P46

UR: Unidade de repetição. IP: *Y. pseudotuberculosis*; Ye: *Y. enterocolitica*; R: Roedor; B: Bovino; H: Humano;

S: Suíno; RJ: Rio de Janeiro; s/i: Sem informacao. (*) Não houve amplificação. PG – Perfil Genotípico. (-)

Perfil genotípico não identificado.

Tabela 5: Características dos VNTRs analisados nas cepas de *Yersinia*.

VNTR	Seqüências dos primers	Tamanho da unidade repetitiva (pb)	Localização no genoma da <i>Y. pestis</i>
ms04	FP: GCGATAACCCACATTATCACAATAACCAA RP: GCTGATGGAACCGGTATGCTGAATTTGCCAC	17	Cromossomo
ms05	FP: GCTTAGCCGCCAGAAAAGGTGAGTTGGC RP: GATAATGGCGGTAGCCGGAATCTGATAATCATC	17	Cromossomo
ms06	FP: AATTTTGCTCCCCAAATAGCA RP: TTTTCCCATTAGCGAAATAAGTA	60	Cromossomo
ms07	FP: GCCACAGGAAGAGGACATTTTCAGAGAAAAC RP: GTTGCTAAAACGATACCGCTACGATCAGC	10	Cromossomo
ms09	FP: CGTTACCCTTGTTGCCAATAGT RP: ACGCAGAACATGCTTACCTTTTAT	18	Plasmídeo pYV
ms20	FP: GCAACCCGCTGAAGTTGTA AAAACCGAC RP: GCGTTGATCTTCGCGGCCTTCAC	15	Cromossomo
ms30	FP: CAATAATACCATCGTGCGTGATAC RP: TATTAATGGTGGTGTAGTCGCTGT	54	Cromossomo
ms45	FP: GCCGGTAGAGGCGTTGTCTTTGGTTTTTTC RP: GTTTTGGGGTTCAGTGCACGCTTGTGAC	12	Cromossomo
ms46	FP: CAGGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG RP: CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA	17	Cromossomo
ms54	FP: GTCCACCATTTTCATACTGTCACCT RP: GCTCTTTGCTCGAATTTTATTGAATG	22	Cromossomo
ms62	FP: GAATCGCGGGTTGACGCTGTTGAGC RP: GCTGAACAGCCCCATAAAAACCGGAGC	9	Cromossomo

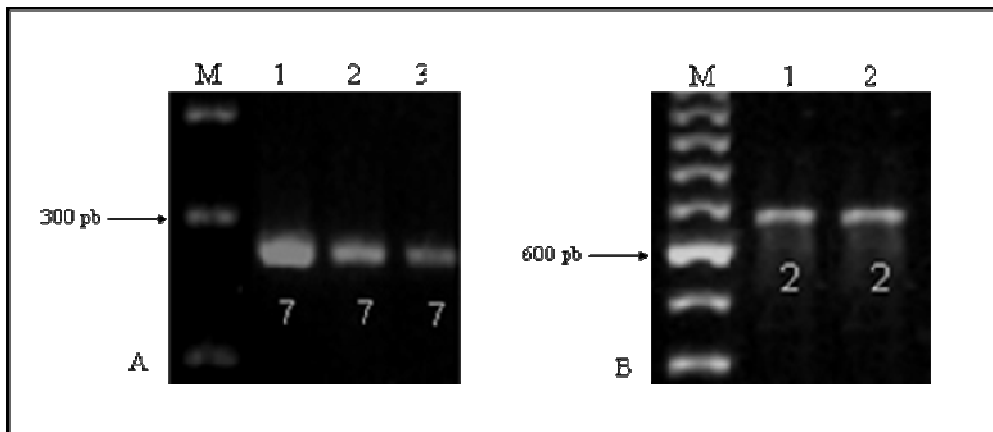


Figura 7: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*. (A) VNTR ms54 - Linhas: 1: PKOL, 2: P. Exu 340 e 3: Kim; (B) VNTR ms30 - Linhas: 1: P. Exu 16 e 2: P. Exu 827. M: Marcador molecular “100 pb DNA ladder”.

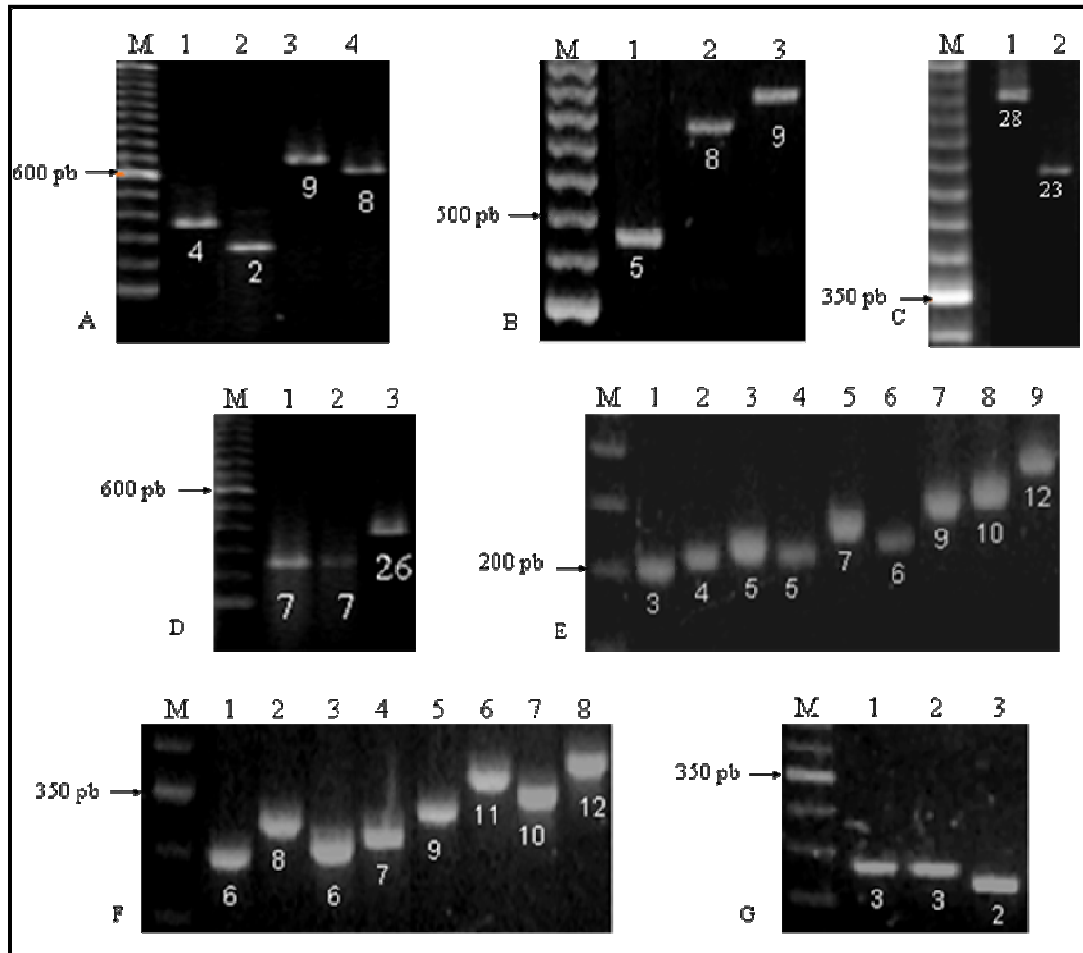


Figura 8: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*. (A) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 16, 2: P. Exu 248, 3: P. Exu 787, 4: P. Exu 384; (B) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 387, 2: P. Exu 373, 3: P. Exu 334; (C) VNTR ms09 - Linhas: 1: P. Exu 827 e 2: P. Exu 16; (D) VNTR ms46 - Linhas: 1: P. Exu 340, 2: P. Exu 15 e 3: P. Exu 16, (E) VNTR ms62 - Linhas: 1: EV76, 2: P. Exu 827, 3: P. Exu 602, 4: P. Exu 623, 5: PKOL, 6: P. Exu 276, 7: Kim, 8: PB8 e 9: Alex; (F) VNTR ms07 - Linhas: 1: Kim, 2: P. Exu 334, 3: Kim; 4: P. Exu 16, 5: P. Exu 769, 6: P. Exu 788, 7: P. Exu 312 e 8: P. Exu 340; (G) VNTR ms45 - Linhas: 1: P. Exu 832, 2: P. Exu 827 e 3: P. Exu 16. M: Marcador molecular “50 ou 100 pb DNA ladder”.

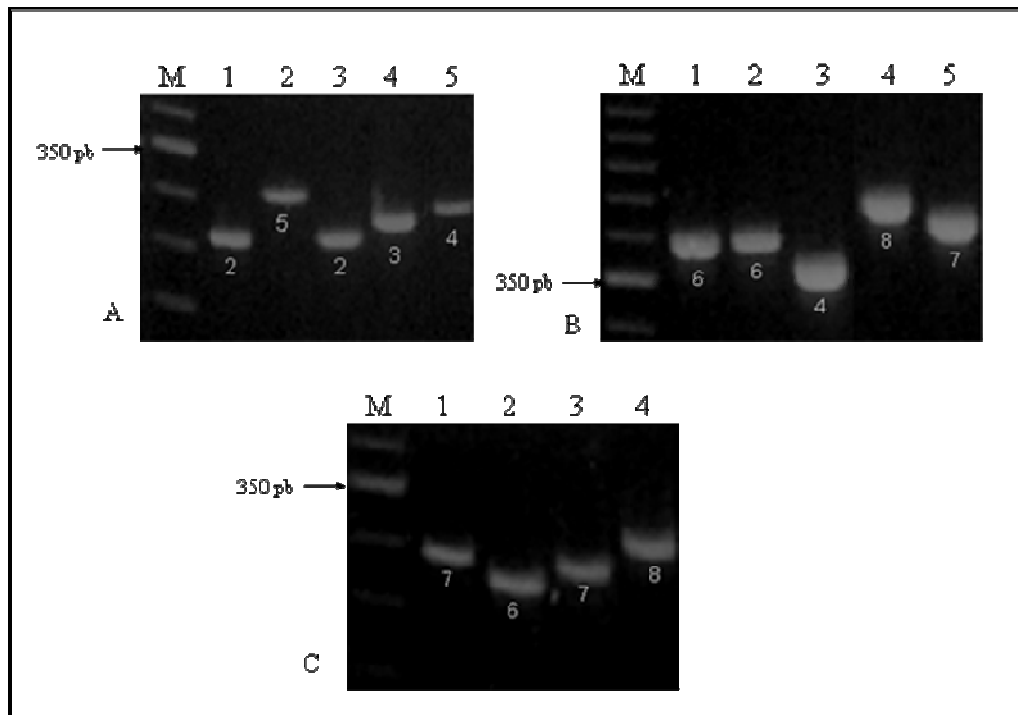


Figura 9: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*. (A) VNTR ms20 - Linhas: 1: Kim, 2: P. Exu 430, 3: PKOL, 4: P. Exu 16 e 5: P. Exu 813; (B) VNTR ms04 - Linhas: 1: P. Exu 16, 2: P. Exu 715, 3: Kim, 4: P. Exu 827 e 5: P. Exu 249; (C) VNTR ms05 - Linhas: 1: P. Exu 845, 2: P. Exu 16, 3: P. Exu 798 e 4: P. Peru 375. M: Marcador molecular “50 ou 100 pb DNA ladder”.

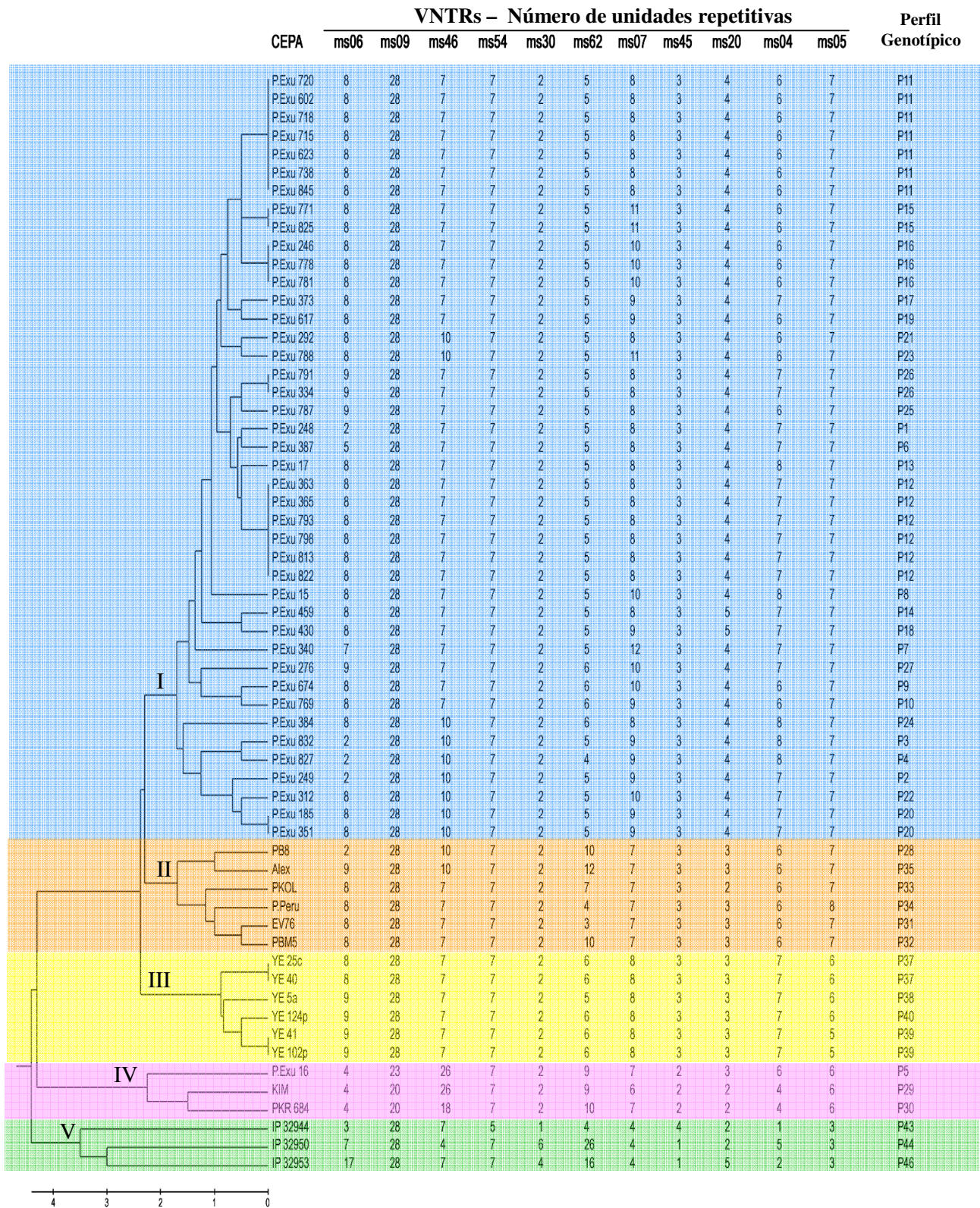


Figura 10: Dendrograma UPGMA mostrando a relação das cepas de *Yersinia* estudadas, os números de unidades repetitivas de cada cepa com os onze locos VNTRs e seus perfis genotípicos. I – V: número de clados.

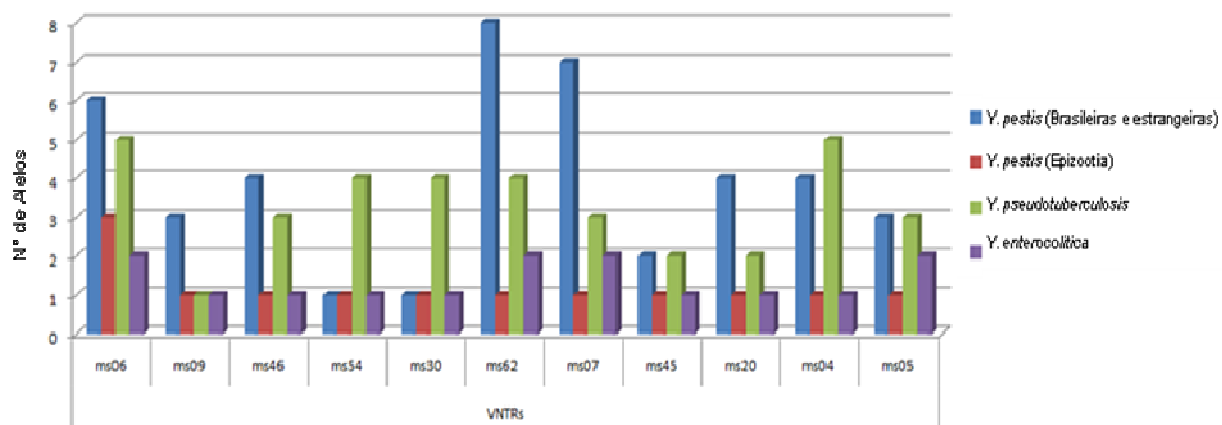


Figura 11: Gráfico de barras demonstrando a relação entre os VNTRs e o número de alelos encontrados nas diferentes espécies de *Yersinia*.

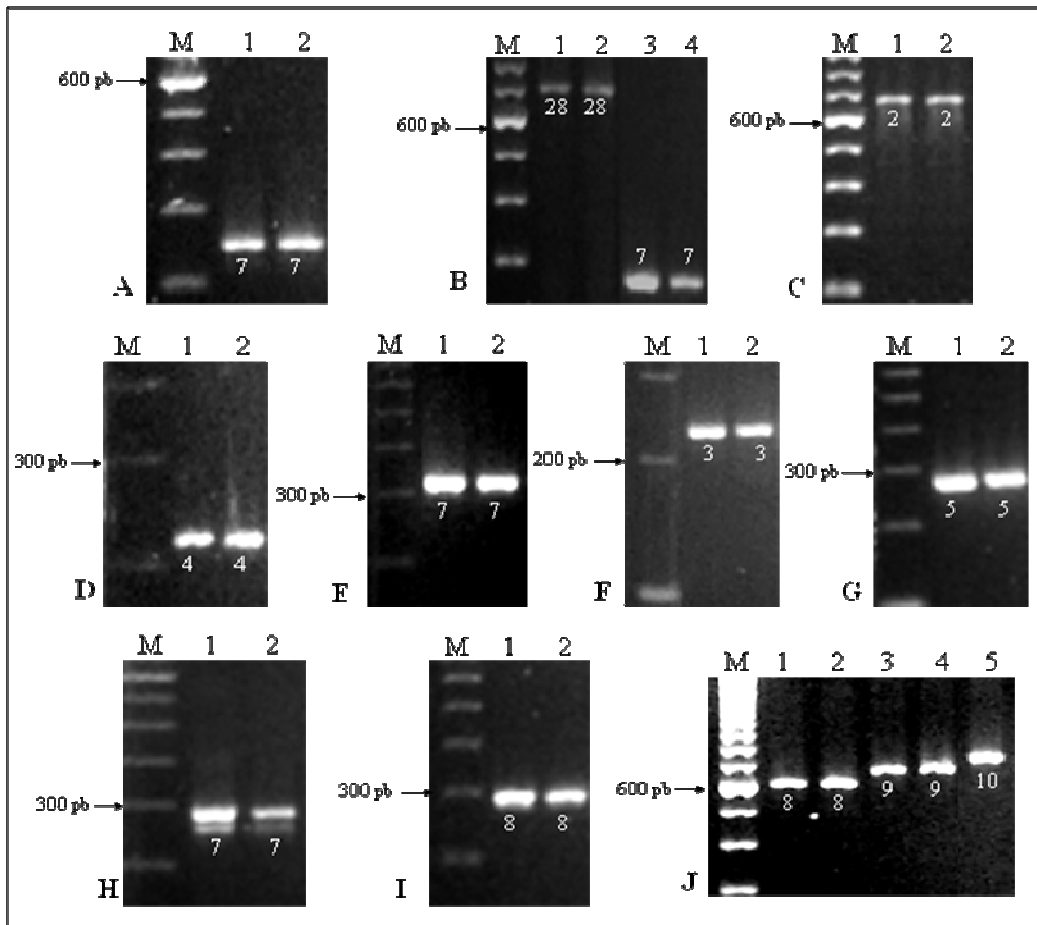


Figura 12: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTRs em culturas das cepas de *Y. pestis* isoladas durante a epizootia. (A) VNTR ms46 - Linhas: 1: P. Exu 30 2S, 2: P. Exu 40 1S; (B) VNTRs ms09, Linhas: 1: P. Exu 47 2S, 2: P. Exu 51 1S e VNTR ms54, linhas: 3: P. Exu 39 2S e 4: P. Exu 47 2S; (C) VNTR ms30 - Linhas: 1: P. Exu 33 1Se 2: P. Exu 57 1S; (D) VNTR ms62 - Linhas: 1: P. Exu 60 2S, 2: P. Exu 31 2S; (E) VNTR ms07 - Linhas: 1: P. Exu 30 1S, 2: P. Exu 31 2S; (F) VNTR ms45 - Linhas: 1: P. Exu 57 1S, 2: P. Exu 57 2S; (G) VNTR ms20 - Linhas: 1: P. Exu 40 1S, 2: P. Exu 31 2S; (H) VNTR ms04 - Linhas: 1: P. Exu 30 1S, 2: P. Exu 31 2S; (I) VNTR ms05 - Linhas: 1: P. Exu 40 1S, 2: P. Exu 31 2S e (J) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 47 CP, 2: P. Exu 47 CG, 3: P. Exu 54 CP, 4: P. Exu 54 CG, 5: P. Exu 59 CG. M: Marcador molecular "100 pb DNA ladder".

9 DISCUSSÃO

No presente trabalho a análise dos onze VNTRs estudados nas 51 cepas de *Y. pestis* brasileiras dos três focos de peste do estado de PE e estrangeiras puderam ser distribuídas em 35 perfis genotípicos denominados de P1 a P35. Esses perfis foram gerados de acordo com o número de cópias das unidades repetitivas (UR) e o tamanho dos *amplicons* obtidos pelo conjunto dos onze VNTRs estudados, de tal modo que as cepas que apresentaram o mesmo número de cópias e tamanho de *amplicons* foram incluídas no mesmo perfil genotípico (Figura 10). Seis perfis genotípicos (P11, P12, P15, P16, P20 e P26) apresentaram uma distribuição que englobava mais de uma cepa, enquanto que os outros perfis genotípicos (P1-P10, P13-P14, P17-P19, P21-P25 e P27), foram restritos a uma única cepa em cada um deles (Tabela 1, 3; Figura 10).

O perfil genotípico P11 agrupou sete cepas do foco da Chapada do Araripe, isoladas de pulga da espécie *Polygenis jordani*, roedores das espécies *Necromys lasiurus* e *Galea spixii*, além de isolados humanos. A maioria das cepas foram isoladas no ano de 1974 no município de Exu-PE, mas também nos anos de 1975 em Araripina e no ano de 1980 em Ipubi - PE. O perfil genotípico P12 agrupou seis cepas, duas isoladas no foco da Chapada do Araripe, no município de Exu - PE e no ano de 1970 e mais quatro cepas na Serra de Triunfo do município de Triunfo-PE nos anos de 1978 e 1979. Neste perfil as seis cepas agrupadas tiveram como fonte de infecção o roedor do gênero *Necromys*. As duas cepas agrupadas no perfil P15 pertencem aos focos da Chapada do Araripe e da Borborema, isoladas de casos humano e pulga da espécie *Polygenis* nos anos de 1975 e 1979. O perfil P16 agrupou três cepas do foco da Chapada do Araripe, dos municípios de Araripina e Granito - PE, nos anos de 1968 e 1975 e foram isoladas de casos humano.

Interessantemente uma dessas cepas, a P. Exu 246 pertence a um biovar atípico e as outras cepas estudadas ao biovar *Orientalis*. O perfil P20 agrupou duas cepas da mesma fonte de isolamento (humano), porém de dois focos diferentes; Chapada da Borborema e Serra de Triunfo nos municípios de Caruaru e Triunfo respectivamente e foram isoladas em diferentes anos 1967 e 1969. O perfil P26 agrupou duas cepas, uma da Serra de Triunfo e outra da Chapada do Araripe correspondendo aos municípios de Triunfo e Exu-PE nos anos de 1978 e 1969, sendo estas isoladas de um roedor e a outra de um caso humano (Tabela 1; Figura 10).

Diante dessa análise com as cepas brasileiras foi observado três casos: **1)** cepas com diferentes características epidemiológicas, foram enquadradas no mesmo perfil genotípico como; P11 (ex; P. Exu 738 e P. Exu 845), P12 (ex; P. Exu 365 e P. Exu 793), P16 (ex; P. Exu 246 e P. Exu 778), P20 (ex; P. Exu 185 e P. Exu 351) e P26 (ex; P. Exu 791 e P. Exu 334) (Tabela 1); **2)** Cepas com as mesmas características epidemiológicas foram enquadradas em perfis genotípicos diferentes, como as cepas dos Perfis P1 (P. Exu 248) e P2 (P. Exu 249) que foram isoladas de casos humanos, no foco de Triunfo, em 1968 e agrupadas separadamente nos perfis genotípicos, pois diferenciaram em dois VNTRs polimórficos o ms46 e ms07 (Tabela1; Figura 10); **3)** Cepas com as mesmas características epidemiológicas foram incluídas no mesmo perfil genotípico como; P11 (P. Exu 602 e P. Exu 718) e P12 (P. Exu 363 e P. Exu 365; P. Exu 793 e P. Exu 798; P. Exu 813 e P. Exu 822) por obterem os 11 VNTRs idênticos.

Assim, apesar de todas as cepas brasileiras de *Y. pestis* terem sido agrupadas num mesmo clado, as 43 cepas foram subdivididas em 26 perfis genotípicos diferentes (P1–P26). Quando comparado cada perfil genotípico entre si foi observado que entre as 43 cepas brasileiras de *Y. pestis* houve uma variação de um a nove VNTRs entre elas quando analisadas pelo MLVA e seus 11 VNTRs. Diante disto observamos que existe uma diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstrada pela análise do marcador molecular MLVA (Figura 10).

O poder discriminatório do MLVA foi calculado por meio do índice numérico (HUNTER; GASTON, 1988) para o conjunto de VNTRs usados e para cada VNTR individualmente nas cepas brasileiras de *Y. pestis*. No entanto a combinação dos 11 VNTRs para tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis* subdividiu as 43 cepas em 26 perfis genotípicos (P1-P26) e elevou o índice discriminatório para 0,95. Segundo Hunter e Gaston (1988), um índice maior que 0,90 pode ser interpretado como confiante e desejável. Este valor do índice discriminatório indica a probabilidade em que dois isolados, aleatoriamente selecionados dentro da população testada, serão classificados em diferentes tipos. Quando o índice discriminatório foi calculado individualmente alguns VNTRs obtiveram valores baixos, chegando até a zero, por serem monomórficos mostrando que o ideal neste estudo foi a combinação dos onze VNTRs.

De acordo com os resultados obtidos com o MLVA das oito cepas de *Y. pestis* isoladas em focos de outros países, oito perfis exclusivos para cada cepa foram observados, denominados de P28 a P35 (Tabela 3; Figura 10). Entre esses perfis genotípicos não foi estabelecida nenhuma correlação relevante entre as informações

epidemiológicas e genéticas. No entanto as cepas estrangeiras de *Y. pestis* de acordo com a análise da construção do dendrograma foram distribuídas em dois cladogramas distintos II e IV. No clado II seis cepas de *Y. pestis* estrangeiras (PB8, Alex, PKOL, P. Peru, EV 78 e PBM5) foram agrupadas e mostraram uma maior proximidade genética com as cepas brasileiras de *Y. pestis* apesar de serem de vários países diferentes (Birmânia, EUA, Curdistão, Peru e Madagascar). A análise comparativa de cada perfil genotípico entre si foi de um a nove VNTRs entre eles (Figura 10).

Curiosamente as outras duas cepas estrangeiras de *Y. pestis* (KIM e PKR 684), ficaram agrupadas no clado IV juntamente com uma cepa brasileira P. Exu 16 e mais próximas geneticamente das *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Vale salientar que estas duas cepas estrangeiras foram isoladas no foco do Iran e pertencem ao biovar Medievales, enquanto todas as outras cepas deste estudo são classificadas como biovar Orientalis e apenas uma apresenta biovar atípico (P. Exu 246). De acordo com a literatura (ADAIR et al., 2000; KLEVYTSKA et al., 2001; LOWELL et al., 2007) o marcador MLVA também é uma ferramenta útil no agrupamento das cepas de *Y. pestis* de acordo com o biovar (Tabela 3, Figura 10).

As seis cepas de *Y. enterocolitica* incluídas na análise para testar a possibilidade de discriminação do MLVA como marcador molecular entre as espécies do gênero *Yersinia*, como a *Y. pseudotuberculosis*, foram agrupadas em um único clado (III) e demonstraram uma maior relação genética com as cepas de *Y. pestis* estrangeiras e dos três focos de peste do estado de PE (Figura 10). A diferença entre as cepas de *Y. enterocolitica* foi de um a dois VNTRs entre elas. Apesar da *Y. enterocolitica* ser considerada uma espécie muito heterogênea possuindo vários biotipos, fagotipos e numerosos sorotipos (BOTTONNE, 1997) foi observado neste estudo um menor polimorfismo nos locos analisados das cepas estudadas do que nas espécies mais homogêneas *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*.

As cepas de *Y. enterocolitica* foram estudadas anteriormente usando a ferramenta molecular RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente). Neste estudo foram analisadas 16 cepas do sorotipo O:3 isoladas de porcos sadios e quatro cepas humanas dos sorotipos O:4, O:5, O:6 e O:13. Estas cepas foram agrupadas em cinco perfis genotípicos; 15 das 16 de porcos sadios tiveram perfis idênticos e as humanas perfis próprios. Seis cepas de *Y. enterocolitica* do estudo anterior (LEAL et al., 1999) foram analisadas neste estudo pelo MLVA. As cepas Ye 25c e Ye 40 foram agrupadas no mesmo perfil genotípico P37 como observado pela análise do RAPD,

agrupadas no perfil P1, diferente das cepas Ye 41 e Ye 102p que se encaixaram no mesmo perfil genotípico P39 neste estudo e com o RAPD se enquadraram em perfis distintos P2 e P5. As demais cepas analisadas pelo MLVA se agruparam em perfis próprios como observado pelo RAPD, Ye 5a no perfil P1 e Ye 124p no perfil P3 (LEAL et al., 1999). No entanto as duas ferramentas moleculares não mostraram diversidade genética entre as cepas de *Y. enterocolitica* estudadas. Provavelmente devido ao fato de que a maioria delas pertencerem ao mesmo sorotipo (Tabela 4).

Em relação as cepas de *Y. pseudotuberculosis*, o clado V agrupou apenas as três cepas incluídas na análise e mostrou uma maior distância genética com as cepas brasileiras de *Y. pestis* do que com as cepas de *Y. enterocolitica*, diferente dos relatos da literatura que descrevem que a *Y. pestis* é um clone que evoluiu da *Y. pseudotuberculosis* (ACHTMAN et al. 1999). Dentro do clado V as três cepas de *Y. pseudotuberculosis* foram subagrupadas em três perfis genotípicos P43, P44 e P46 (Figura 10). A análise comparativa entre cada perfil genotípico demonstrou que a diferença entre eles foi de seis ou sete dos 11 VNTRs analisados. Sugerindo que apesar de pouca representatividade das cepas foi observada uma elevada diversidade genética entre elas.

Até o momento não tinham sido encontrados marcadores que apresentassem diferenças com *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, pois como existe mais de 90% de homologia entre estes genomas não é fácil a separação destas espécies mesmo utilizando os marcadores moleculares. No entanto, o emprego do MLVA nesta análise foi possível diferenciar as três espécies de *Yersinia* estudadas e observar diversidade genética entre elas sendo que uma maior diversidade entre as cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*.

A ausência de amplificação dos segmentos pelos VNTRs ms06, ms30, ms45 e ms05 para algumas cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* pode ter acontecido pelo fato de que os VNTRs estudados foram todos descritos na literatura especificamente para *Y. pestis* (LÈ FLECHE et al. 2001; KLEVYTSKA et al. 2000) pois foram feitas várias tentativas de amplificação para essas cepas sem nenhum resultado promissor. Ainda assim, foi possível agrupar as duas cepas de *Y. pseudotuberculosis* e duas das três cepas de *Y. enterocolitica* em seus devidos perfis, pois os dados existentes já a enquadravam em um perfil distinto das demais. A cepa de *Y. enterocolitica*, Ye 25L, não pode ser agrupada em nenhum perfil devido a falta de

amplificação do VNTR ms05. Provavelmente pela falta deste VNTR no genoma desta cepa.

A análise do MLVA com as cepas da epizootia, ocorrida num mesmo local, período e os repiques das culturas pareadas das cepas P. Exu 57 (1S e 2S) e P. Exu 60 (1S e 2S) não obtiveram perda ou ganho de repetições nos VNTRs estudados como já era esperado, uma vez que apresentaram o mesmo número de unidades repetitivas e tamanho dos *amplicons* para os dois subcultivos de cada cepa (Tabela 2). Sugerindo a estabilidade destas regiões no genoma da *Y. pestis*.

Neste estudo foi possível verificar que as cepas de *Y. pestis* obtidas durante a epizootia ocorrida numa pequena propriedade, na Chapada do Araripe em Pernambuco obtiveram uma estreita relação genética revelada por dez marcadores monomórficos e apenas um marcador polimórfico. Estes resultados são extremamente relevantes quando comparados com os dados encontrados por OLIVEIRA (2006) e VALDEVINO-NETO (2006) e que neste estudo, usaram os mesmos marcadores VNTRs, analisando cepas de um surto de Peste ocorrido em 1986 no estado da Paraíba e cepas do foco de Exu-PE.

No entanto, as cepas do surto da Paraíba e do foco de Exu – PE estavam distribuídas em diferentes municípios, sítios, períodos e fontes de isolamento (roedor, pulga, e homem). Esta análise permitiu distribuir as 19 cepas do surto da Paraíba de 1986 em seis perfis genotípicos e as 43 cepas do foco de Exu – PE em 35 perfis genotípicos. Diante disso, pode-se considerar os VNTRs escolhidos como bons marcadores moleculares, pois eles foram capazes de mostrar diferenças (polimorfismo) quando analisando cepas consideradas epidemiologicamente diversificadas e mostraram também monomorfismo quando comparados com cepas relacionadas epidemiologicamente (ARAÚJO, 2007).

Diferentes grupos utilizaram o MLVA para verificar homologia em cepas determinantes de um surto e também demonstraram que cepas não relacionadas epidemiologicamente apresentaram diferentes perfis em cepas de *Y. pestis* de outros focos (KLEVYTSKA et al. 2001; LE FLÈCHE et al. 2001; POURCEL et al. 2004; LOWELL et al. 2005). No entanto, a aplicação do MLVA em estudos com cepas brasileiras de *Y. pestis* tem iniciado recentemente a compreensão da epidemiologia das cepas de diferentes focos do Brasil. O estudo ainda encontra-se em andamento e contribuirá para estudos futuros da compreensão e entendimento da epidemiologia das cepas brasileiras de *Y. pestis*.

Estudos de tipagem molecular utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD, perfil plasmidial, PCR-ribotipagem) em cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstraram um baixo poder discriminatório revelando, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes, ano e local de isolamento, mostrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos.

No entanto o MLVA tornou-se uma ferramenta útil nos estudos filogenéticos e epidemiológicos das cepas brasileiras de *Y. pestis* por revelar heterogeneidade dessa espécie, considerada até então homogênea; permitir o rastreamento de cepas durante os surtos; mostrar homogeneidade na análise de cepas relacionadas epidemiologicamente e heterogeneidade nas cepas de diferentes características epidemiológicas e ainda foi capaz de diferenciar as espécies de *Yersinia*, sendo uma ferramenta útil nos estudos intraespecíficos, além de separar as cepas de *Y. pestis* de outros países. Diante disto, os resultados obtidos neste estudo com os 11 VNTRs revelaram que existe diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* e esta diversidade estava sendo subestimada com o uso de outros marcadores moleculares. No entanto novas investigações com um número maior de VNTRs se faz necessário para reforçar a hipótese de diversidade das cepas brasileiras de *Y. pestis* e descartar a possibilidade de ocorrência de mutações durante a estocagem destas cepas no laboratório.

10 CONCLUSÕES

A análise pelo MLVA revelou diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes, focos e períodos com a aplicação dos onze VNTRs;

A aplicação do MLVA com a combinação dos onze VNTRs aumentou o poder discriminatório da técnica;

Embora, *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* sejam geneticamente relacionadas e não tendo sido encontradas diferenças entre essas espécies com outros métodos de tipagem, o MLVA revelou diversidade genética nessas duas espécies e maior distância genética;

O MLVA mostrou-se uma ferramenta útil em estudos filogenéticos e epidemiológicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, além de estudos intraespecíficos do gênero *Yersinia*;

A continuação do estudo poderá gerar dados importantes para estabelecer relações filogenéticas entre as cepas, contribuindo para um melhor entendimento da disseminação e transmissão do agente na natureza e a dinâmica da epidemiologia da peste no Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p. 14043-14048, 1999.

ADAIR, D. M. et al. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1516-1519, 2000.

ALMEIDA, A. M. P et al. Plague surveillance in Brazil: 1983-1992. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.37, p. 511-516, 1985.

ALMEIDA, A. M. P. et al. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, v. 2, cap. 126, p. 1509-1522, 2005.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, M. R. Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* do Nordeste do Brasil pela amplificação por PCR dos *Variable-Number Tandem Repeats* (VNTR's). 2005. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ARAÚJO, M. R. Caracterização molecular de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante uma epizootia no foco da Chapada do Araripe, pela análise do número variável de repetições em tandem (MLVA). 2007. Monografia (Curso de Especialização em Biologia Molecular) – Universidade de Pernambuco, Recife, 2007.

BARROS, M.P.S. Padronização e Avaliação da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGA) para tipagem molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no nordeste brasileiro. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2007.

BERTHERAT, E. **Abstract Interregional Plague Meeting, Antananaviro, Madagascar**. 2006.

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

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes infection**, v. 3, p. 561- 569, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Plague [USA: s.n., s.d.]. Disponível em: < <http://www.cdc.gov>>. Acessado em: Fev. de 2007.

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES: Manual de Peste [Brasil: s.n., s.d.]. Disponível em: < <http://www.cpqam.fiocruz.br>>. Acesso Fevereiro de 2007

CHAIN, P. S. G., et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4453-4463, 2006.

CHASE, C. J. et al. Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 1778-1785, 2005.

CHU, M. Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests. **CDC/WHO. Geneve**, p. 129, 2000.

CORNELIS, G. R. Molecular and cell biology aspects of plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 16, p. 8778-8783, 2000.

COURA, J. R. et al. Focos inveterados de Peste no Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 1, p. 293-310, 1967.

DE BENITO, I. et al. A polymorphic tandem repeat potentially useful for typing in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Microbiology JMG**, v. 150, p. 199-204, 2004.

DENG, W. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 4601-4611, 2002.

DEVIGNAT, R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hipóthèse. **Bulletin de l'organazition Mondial de la Santé**, v. 4, p. 247- 263, 1951.

DRANCOURT, M., RAOULT, D. Molecular insights into the history of plague. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 105-109, 2002.

- DU, Y. et al. A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection Immunology**, v. 70, p. 1453- 1460, 2002.
- FARLOW, J. et al. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeats analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3186-3192, 2001.
- FILIPPOV, A. A. et al. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. **FEMS Microbiololgy Letters**, v. 67, p. 45-48, 1990.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Peste em: **Guia de Vigilância Epidemiológica**, v. 5, p. 641-652, 2002.
- GAGE, K. L., KOSOY, M. Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 505-528, 2005.
- GALIMAND, M. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **New England Journal of Medicine**, v. 4, p. 677- 680, 1997.
- GIRARD, J. M. et al. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, p. 8408 - 8413, 2004.
- GUIYOULE, A. et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. **Emerging Infection Disease**, v. 7, p. 43 - 48, 2001.
- HAMMING, R. Error-detecting and error-correcting codes. **Bell System Technical Journal**, v. 29, p. 147-160, 1950.
- HINNEBUSH, B. J., PERRY, R. D., SCHWAN, T. G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. **Science**, v. 273, p. 367 - 370, 1996.
- HINNEBUSH, B. J. et al. A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, v. 296, p. 733-735, 2002.
- HU, P. et al. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5192-5202, 1998.

- HUANG, X. Z. et al. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1164-1173, 2002.
- HUNTER, P. R., GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.
- INGLESBY, T.V. et al. Plague as a Biological Weapon. **Medical and Public Health Management**, v. 283, p. 2281-2290, 2000.
- JEFFREYS, A. J. et al. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.
- KARIMI, Y. et al. Sur l'écologie des puces impliquées dans l'épidémiologie de la Peste et le rôle éventuel de certains insectes hématophages dans son processus au Nord-Est du Brésil. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 67, p. 583-591, 1974.
- KARIMI, Y. Diagnostic rapid de l'infection Pesteuse au laboratoire. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales**, v. 71, p. 45-48, 1978.
- KEIM, P. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2928-2936, 2000.
- KLEVYTSKA, A. M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3179-3185, 2001.
- KOSTMAN, J. R. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2084-2087, 1992.
- KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief Bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.
- LE FLÈCHE, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. **Microbiology**, v. 1, p. 2, 2001.

- LEAL, N. C. Potencial do uso de PCR e Hibridização com sondas moleculares no estudo *Yersinia pestis*. 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.
- LEAL, N. C., ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 339-342, 1999.
- LEAL, T. C. A. et al. RAPD-PCR Typing of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) O:3 Serotype strains isolated from pigs and humans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 3, p. 315-319, 1999.
- LEAL, N. C., et al. A simple PCR based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 371-375, 1996.
- LEAL, N. C. et al. Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in Northeast Brazil. **Rev Microbiol**, v. 28, p. 40-45, 1997.
- LEAL, N. C. et al. Homology among extra cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 20-24, 2000.
- LEAL, N. C. et al. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 447-454, 2004.
- LEAL-BALBINO, T. C. et al. Differences in the Stability of the Plasmids of *Yersinia pestis* Cultures in Vitro: Impact on Virulence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 727-732, 2004.
- LEAL-BALBINO, T.C. et al. The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. **Genetic and Molecular Biology**, v. 99, p.727-732, 2006.
- LEAL-BALBINO, T.C. et al. Peste e Tularemia. In: MARCONDES, Carlos Brizola. Doenças transmitidas e causadas por Artrópodes. 1ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2009. C. 5. P. 69 – 83.
- LINDLER, L. U. et al. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. **Infection and immunity**, v. 66, p. 5731-5742, 1998.

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

LOIEZ, C. et al. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4873-4875, 2003.

LOWELL, J. L. et al. Identifying sources of human exposure to plague. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 650-656, 2005.

LOWELL, J. L. et al. Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. A **Journal of the Society for General Microbiology**, v. 153, p. 169 – 177, 2007.

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 725-774, 1998.

MOLLARET, H. H. Le cas de la Peste. **Annales de démographie historique**, p. 101-110, 1989.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT – MMWR. **Human Plague**, v.55, p. 940-943, 2006.

MOTIN, V.L. et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1019-1027, 2002.

OLIVEIRA, M. B. M. Diversidade genética em cepas de *Yersinia pestis*. Resumo de tese de doutorado – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 222, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Plague in the Americas. **Scientific Publication**, v. 115, 1965.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Plague Manual. Epidemiology, distribution, Surveillance and control. **WHO/CDC/CSR/EDC**, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Human plague in 2002 and 2003. **Weekly Epidemiological Research**, v. 79, p. 301-308, 2004.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Weekly epidemiological record**, v. 81, p. 273-284, 2006.
- PARKHILL, J. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. **Nature**, v. 413, p. 523-527, 2001.
- PERRY, R. D., FETHERSTON, J. D. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology**, v. 10, p. 35-66, 1997.
- PEREIRA, M. S. V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 1-5, 2002.
- POLLITZER, R. History and present distribution of plague. **In: Plague. W.H.O. Monograph serier**, v. 22, p. 11-45, 1954.
- POURCEL, C. et al. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **Microbiology**, v. 4, p. 22, 2004.
- RORING, S. et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2126-2133, 2002.
- SNEATH, P. H., SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, v. 193, 855-860, 1962.
- SOBREIRA, M. Analisis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of diferent bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 68, 2002.
- SODEINDE, O. A., GOUGUEN, J. D. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection Immunity**, v. 56, p. 2743-2748, 1988.
- SODEINDE, O. A. et al. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. **Infection Immunity**, v. 56, p. 2749-2752, 1988.
- SONG, Y. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA Researsh**, v. 11, p. 179-197, 2004.

SOUZA, G. T. Avaliação da técnica Nested-PCRTbU para aplicação no diagnóstico da Peste. 2005. Dissertação (Mestrado) – Núcleo Educacional de Saúde Pública – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2005.

SOUZA G. T. et al. Development and Evaluation of single tube Nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 603, p. 351-359, 2007.

STENSETH, N.C. et al. Plague: Past, Present, and Future. **PLOS Medicine**, v. 5, p. 09-13, 2008. Disponível em: < <http://www.plosmedicine.org>>. Acesso em: set. de 2008.

STRAND, S. T. A. et al. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274-276, 1993.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Multilocus variable-number tandem-repeats polymorphism among brazilian *Enterococcus faecalis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4879-4881, 2004.

VALDEVINO NETO, A. A. Tipagem Genética de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no estado da Paraíba. 2006. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade Frassinetti do Recife. 2006.

VAN BELKUM, A. et al. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection Immunity**, v. 65, p. 5017-5027, 1997.

VAN BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 275-293, 1998.

VAN BELKUM, A. et al. Occurrence and structure-function relationship of pentameric short sequence repeats in microbial genomes. **Research Microbiology**, v. 150, p. 617-626, 1999.

ZHOU, D. et al. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. **Microbes and infection**, v. 6, p. 1226-1234, 2004.

APÊNDICE A – Artigo Científico

LAM – 2008 – 1326

Revised manuscript

Genetic Diversity in Brazilian Strains of *Yersinia pestis*

M.B. Melo-Oliveira¹, M.R. Araújo², M.P.S. Barros², V.M. Silveira-Filho^{2,3}, N.C. Leal²,
V.Q. Balbino³, A.M.P. Almeida², T.C. Leal-Balbino²

1 Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, PE, Brazil.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz), Recife, PE, Brazil

3 Departamento de Genética, UFPE, Recife, PE, Brazil.

Abbreviated running headline: Genetic diversity of *Y. pestis*

Correspondence

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
(CPqAM/Fiocruz). Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. 50670-
420. Tel: 55-81-2101.2633. Fax: 55-81-2101.2647. E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br;
tcristinaleal@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aims: To assess the utility of the genetic typing system based on the analysis of a multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) called MLVA for discriminating Brazilian *Yersinia pestis* isolates.

Methods and Results: MLVA based on 12 VNTRs loci was performed on 37 *Y. pestis* strains from two different ecological complexes during two different epidemiological events. MLVA allowed the distribution of the strains into different genotypes. Among 20 strains tested from an epizootic, all but four fell into a single clade and were sub-grouped into three MLVA genotypes. Among 17 strains from an outbreak, each one displayed a unique amplification profile, allowing discrimination of 17 MLVA genotypes distributed into four clades. The 12 VNTRs loci were found to be stable through multiple serial subcultures in the laboratory of three unrelated cultures included in this study to assess the stability of the VNTRs *in vitro*.

Conclusions: MLVA demonstrated intra-specific genetic diversity in the samples studied, suggesting that the genetic diversity of Brazilian strains has so far been underestimated.

Significance and Impact of the Study: The results obtained will contribute to a better understanding of plague epidemiology and *Y. pestis* epidemiology and population structure in Brazil.

Keywords: *Yersinia pestis*, plague, epizootic, outbreak, VNTR, MLVA.

INTRODUCTION

Yersinia pestis, the causative agent of plague, arrived in Brazil by sea in 1899, during the third pandemic, and established several natural foci in several ecological complexes disseminated mainly in the northeast region. These foci are autonomous, i.e., totally independent of each other and there is no connection between them. They have different epidemiological characteristics and patterns of manifestations of the disease in the human population, with alternating periods of high incidence followed by others of low-incidence or even absence of cases (Baltazard 1968a).

Until the 1970s, the number of human cases reported annually ranged from 20 to 100. Afterward, all foci tended toward quiescence, some since the 1970s and the others since the 1980s, and the latest outbreaks occurred in the states of Ceará and Paraíba in the 1980s. Epidemiological investigations and surveillance activities in plague areas yielded 917 *Y. pestis* strains from rodents, fleas and humans from 1966 to 1997 (Almeida *et al.* 2007).

Attempts have been made to genotype many of these isolates using several approaches, such as RAPD-PCR and PCR-ribotyping, and in almost every case, these various approaches have found no differences among isolates, even across multiple host species, different geographic origins, or years (unpublished results).

A high-resolution system based on the analysis of multiple VNTR (variable number tandem repeat) loci called MLVA revealed a promising approach for discriminating *Y. pestis* strains (Adair *et al.* 2000; Klevytska *et al.* 2001; Achtman *et al.* 2004; Girard *et al.* 2004; Pourcel *et al.* 2004; Lowell *et al.* 2005).

In the present work, we examined the utility of MLVA for discriminating Brazilian *Y. pestis* isolates. The results obtained by the analysis of 12 VNTRs demonstrated intra-specific genetic diversity in the samples studied, revealing that MLVA has a higher

discriminatory power. This is the first description of genetic diversity found within *Y. pestis* populations in Brazil, which will contribute to future in-depth epidemiological studies. The 12 VNTRs loci were shown to be stable during serial subcultures in the laboratory of three unrelated cultures included in this study to assess the stability of the VNTRs *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Strains studied

The study involved 37 *Y. pestis* strains: 20 isolated from rodents and fleas during an epizootic in August, 1967, in Sítio Alagoinha, a property located in the Chapada do Araripe in the state of Pernambuco (Almeida *et al.* 1985); 17 from an outbreak involving several municipalities in the Planalto da Borborema in the state of Paraíba in 1986 (Almeida *et al.* 1989). Three unrelated strains (P. CE 882, P. Exu 340 and P. Peru 375) and 11 derivative cultures obtained through multiple serial subcultures of the parental strains (Leal-Balbino *et al.* 2004) were included to assess the stability of the VNTRs *in vitro*. Figure 1 shows the location of Brazilian plague foci and the origin of the strains investigated.

Epizootic strains were identified as P (plague), Exu (location of the laboratory) followed by the sequential number of isolations. Two subsequent subcultures were made from the original cultures at different years. In this work, they are identified as 1st subculture (1S) and 2nd subculture (2S). Outbreak strains were identified as P (plague) and PB (state of origin), followed by the sequential number of isolations.

Culture conditions

The strains are from the National Service for Reference in Plague from the Aggeu Magalhães Research Center (SRP/CPqAM). They are maintained in blood agar

base (BAB, Difco) under refrigeration at 4°C. For the studies, the strains were grown in brain heart infusion broth (BHI, Difco) at 28°C and inspected daily for up to seven days. Each culture grown during this period was plated in BAB, incubated at 28°C and analyzed daily for up to five days for the morphology of the developing colonies. Confirmation of the identification and purity of the cultures was carried out by the plague phage test (Karimi 1978).

VNTR primers

A set of 12 VNTR primers were selected for PCR amplification using the strains' DNA on the basis of the high polymorphism potential revealed on previous works: 1AB (Adair *et al.* 2000); ms04, ms05, ms06, ms07, ms09, ms20, ms30, ms 5, ms46, ms54 and ms62 (Le Flèche *et al.* 2001).

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was prepared as described by Souza *et al.* (2007). The PCR assays were carried out in a final volume of 25 µl containing 20 ng of DNA, 20 pmol l⁻¹ of each primer, 50 mmol l⁻¹ KCl, 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 0.16 mmol l⁻¹ deoxynucleoside triphosphates (dNTPs-Invitrogen, Brazil), 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Brazil).

For the primer 1AB, the thermocycler (Biometra) was programmed for 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. For other primers, the program was 96°C for 5 min, followed by 34 cycles of 96°C for 20 s, 60°C for 30 s and 65°C for 1 min, with a final extension at 65°C for 5 min.

The amplicons were separated by electrophoresis in 2.5% agarose gels in Tris-borate at 100 V, stained with ethidium bromide (1µg ml⁻¹), and images were captured

under UV illumination by using the software 1D Image Analysis, version 3.5 (Digital Kodak Science). A 100 bp DNA ladder was used as standard (Invitrogen, Brazil).

Cluster Analysis

The software 1D Image Analysis, version 3.5 (Digital Kodak Science) was used to determine the size of the amplicons. The copy number of the repeats was determined based on Adair et al. (2000). One representative amplicon of each VNTR was sequenced to confirm the size and the number of the repeats. Due to the small size of the repeat (4pb) all the amplicons generated with primer 1AB were sequenced for confirmation of their size and the number of repeats. The similarity among the profiles was estimated by the categorical coefficient (Hamming, 1950) and the genotypes were grouped by the algorithm UPGMA (Sneath and Sokal 1962) using the MEGA software version 4.0 (Kumar *et al.* 2008).

Sequencing

For sequencing the amplicons were purified with the kit purelink PCR (Invitrogen, Brazil) following the recommendations of the manufacturer.

The sequencing reaction was performed with the same primers used for the PCR amplifications using an automatic sequencer ABI 3100 of 16 capillaries (Applied Biosystems), using the “Bigdye Kit” (Applied Biosystems). The sequences obtained were analyzed by the programs: BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.* 1997); Seq Tools V. 8.3.022 (<http://www.seqtool.dk>) and Bio Edit V. 7.0.5.2 (Hall 1999). The number of repeats was determined by the “Tandem repeats finder program” (Benson 1999).

RESULTS

Of the 40 subcultures (1S and 2S) from the 20 epizootic *Y. pestis* strains, only 22 grew. Among them, six were from the first subculture and 16 from the second. Paired growth (1S and 2S) was observed with only two strains (P. Exu 57 and P. Exu 60).

All the cultures tested yielded PCR products with the primers for all the 12 VNTR loci used for MLVA. Five loci were monomorphic in the three sets of cultures analyzed. The copy number of the repeats for the monomorphic VNTR was nine (1AB), 28 (ms09), seven (ms46 and ms54) and two (ms30).

The epizootic strains differed at only one VNTR (ms06) by amplicon size and copy number (Fig. 2, 3, 4). For the other VNTR the copy number of the repeats was four (ms62), seven (ms07), eight (ms05), three (ms45), five (ms20) and seven (ms04).

The amplification pattern of the two paired subcultures available from the strains P. Exu 57 and P. Exu 60 (1S and 2S) matched. All but four strains from the epizootic (P. Exu 67_{2S}, 36_{2S}, 44_{1S}, 54_{2S}.) were grouped into a single clade (Fig. 4) and sub-grouped into three MLVA genotypes called in this work P1 to P3. The majority of the cultures (16) fitted into the P1 genotype (Fig. 4).

The outbreak strains differed by amplicon length and copy number at seven loci: ms62 (04, 05, 06 repeats), ms07 (03, 04, 05, 06, 07, 11 repeats), ms45 (02, 03 repeats), ms20 (07, 08, 09, 10 repeats), ms04 (03, 04, 05 repeats), ms05 (08, 09, 10 repeats) and ms06 (08, 09) generating two to six alleles (Fig. 2). The human isolates could not be linked to those from rodents. Each of the cultures tested displayed a unique amplification profile, allowing the discrimination of 17 MLVA genotypes named P4 to P20 and distributed into 4 clades (Fig. 4).

Analysis of the 12 loci in the parental strain and their derivatives obtained by multiple serial subcultures of the strains P. CE 882, P. Peru 375 and P. Exu 340

revealed identical patterns between the parental and derived cultures (data not shown). Each culture displayed a unique MLVA genotype named P21 to P23, respectively (Fig. 4).

DISCUSSION

In the present work, a phylogenetic analysis based on 12 VNTRs performed on 20 strains from an epizootic on a small property, in the focus of Chapada do Araripe in the state of Pernambuco in 1967, grouped all but four strains into a single clade (Fig. 4), indicating a low genetic diversity among them. These strains differed at only one VNTR (ms06) by amplicon size and copy number (Fig. 2 and 3). Concerning this locus most strains have eight repeat units, three have nine repeat units, and one has 10. Locus ms06 is one of the *Y. pestis* CRISPR loci, described in detail by Pourcel et al., (2005) and Cui et al., (2008). The classical Orientalis allele at this locus has eight spacers, called a1 to a8 (Cui et al., 2008). The results obtained here suggest that new spacers have been recently acquired.

The majority of the epizootic strains fitted into a single MLVA genotype, suggesting that they were all from a single “epizootic path.” This predominant genotype was detected in strains from the wild rodent *Necromys lasiurus* and its fleas (*Polygenis bolshi jordani*), and from the commensal rat (*Rattus rattus*), and the rat flea, *Xenopsylla cheopis*, collected on the soil of homes. Genotype P2 grouped a few strains from the rat (*R. rattus*) and from *P. b. jordani*, collected from *N. lasiurus*. After studies on the ecology of plague in the focus of Chapada do Araripe, Baltazard (1968b) concluded that *Y. pestis* progresses as individual “epizootic paths” winding their way randomly in short incursions through the fields exterminating the populations of rodents afflicted. Given the extreme sedentary nature of rodents and the small radius of their excursions, such

“epizootic paths” progress slowly and cover very small areas. Each “path” winds its way through the fields autonomously. This behavior could explain the presence of the same MLVA genotype among the different species of rodents and fleas from the epizootic in a small location.

According to Baltazard (1968b), although the field rodent *N. lasiurus* and its fleas (*Polygenis* spp.) are the species by far the most frequently infected in the wild, playing an important role in plague amplification, other species of rodents and fleas are also involved. Our results provide further evidence of the interchange of the infection between the wild rodent hosts and the commensal rat and their fleas in the Brazilian foci.

In the focus of Planalto da Borborema, after a quiescent period, an outbreak emerged in September 1986 and spread quickly through 41 municipalities affecting humans and several species of rodents from numerous localities. Studies on the *Y. pestis* strains obtained from this outbreak did not detect differences among them (Almeida *et al.* 1989). However, MLVA revealed a high degree of diversity of genotypes among these strains as each one had its own genotype, even those from the same rodent species, from the same location. One strain from one patient and strains of four species of rodents: *R. rattus* (1), *N. lasiurus* (2), *Holochilus sciureus* (1) and *Oryzomys subflavus* (1), from the same property were all different, which could mean that their source of infection was not the same. Therefore, it appears that distinct *Y. pestis* populations (several “epizootic paths”) circulated in the area of the focus during this outbreak.

According to Baltazard (1968b), when the rodent population density is high, each “epizootic path” extends and ramifies crossing and criss-crossing other “paths,” and

until the climax of the rodent multiplication, the epizootic spreads over vast areas reaching all species, at which time human cases arise.

In spite of the genetic diversity observed among the outbreak strains, it is possible to establish a genetic relationship between these isolates that differentiated by only one or two VNTRs as can be verified by the low (2.5) coefficient of discrimination (Fig. 4).

Leal-Balbino *et al.* (2004, 2006) and Leal *et al.* (2000) observed spontaneous alterations in the genome (plasmidial and chromosomal) of Brazilian *Y. pestis* through prolonged storage and manipulation in the laboratory. However, the analysis of the 12 VNTRs loci in the three parental strains and their derived cultures did not detect alteration in the studied regions, confirming their stability as previously observed (Adair *et al.* 2000, Keim *et al.* 2000). Further evidence of the stability of the VNTRs was provided by the two paired subcultures available from the strains P. Exu 57 and P. Exu 60 (1S and 2S) which yielded the same MLVA profile.

Due to the temporal and spatial differences, it was not surprising that among the three unrelated strains (two Brazilian and one from Peru), each one had its own genotype which did not match any of the genotypes found among the epizootic or outbreak strains. In spite of the geographical distance (Fig. 1), P. CE 882 and P. Peru 375 were genetically closer to the epizootic strains, whereas P. Exu 340 was closer to the outbreak strains (Fig. 4), although originating geographically closer to the epizootic area.

In conclusion, different MLVA genotypes were found among the epizootic strains, outbreak strains and the three unrelated strains P. CE 882, P. Exu 340 and P. Peru 375. The genetic diversity among the strains from the outbreak was higher than that found among the strains from the epizootic. The results with MLVA based on 12 VNTRs revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic suggesting that the

genetic diversity of Brazilian strains has so far been underestimated. This is the first description of genetic diversity found within *Y. pestis* populations in Brazil, which will contribute to future in-depth epidemiological studies.

Further studies with all the 43 VNTRs markers previously described for *Y. pestis* (Adair *et al.* 2000, Klevytska *et al.* 2001, Girard *et al.* 2004) would contribute to a better understanding of the changes that occurred in *Y. pestis* genome over time in the Brazilian foci.

FIGURE CAPTIONS

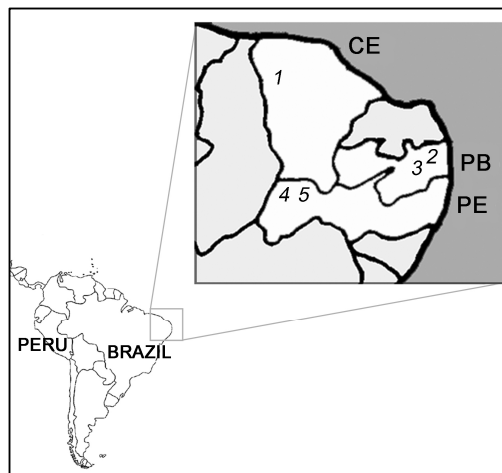


Figure 1 Geographic origin of the *Yersinia pestis* strains investigated. CE: Ceará (1: Ipu); PB: Paraíba (2: Solânea, 3: Remígio); PE: Pernambuco (4: Ipubi, 5: Exu).

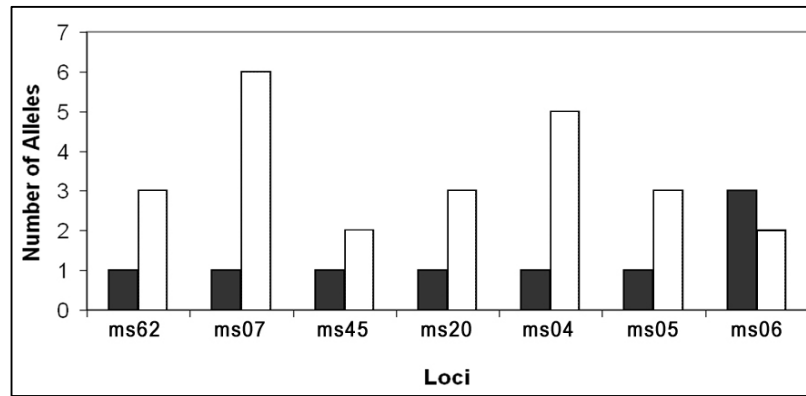


Figure 2 Distribution of the number of alleles generated in the epizootic (black bars) and outbreak (white bars) *Yersinia pestis* strains with the seven polymorphic VNTRs.

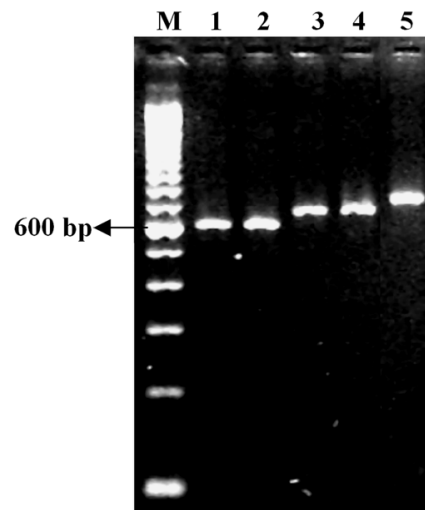


Figure 3 2.5% agarose gel electrophoresis of ms06 locus representative of the MLVA polymorphism. Lanes, M: molecular weight marker (100-bp DNA ladder); 1: P. Exu 47_{2S}; 2: P. Exu 42_{2S}; 3: P. Exu 54_{2S}; 4: P. Exu 44_{1S}; 5: P. Exu 67_{2S}.

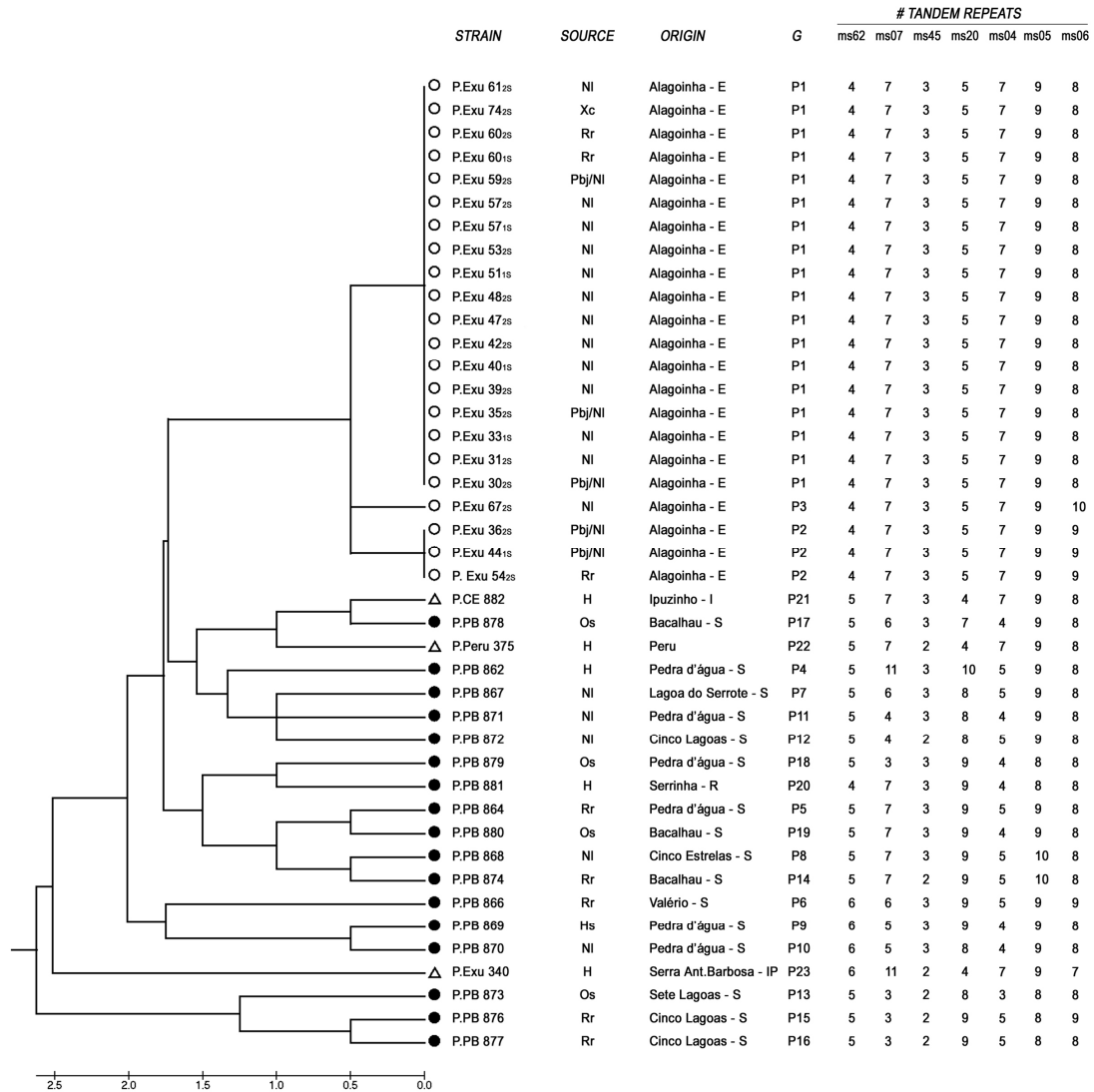


Figure 4 UPGMA dendrogram showing clustering and linkage distances of the *Yersinia pestis* strains studied their origin and distribution by genotypic groups. Abbreviations: G: genotype; H: human; Hs: *Holochilus sciureus*; NI: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Xc: *Xenopsylla cheopis*; Pbj/NI: *Polygenis bolshi jordani* from *N. lasiurus*; I: Ipu; S: Solânea; E: Exu; R: Remígio; IP: Ipubi. ○ Epizootic; ● Outbreak, △ Control (P.CE 882, P. Peru 375; P. Exu 340).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silvana Santos from the Department of Microbiology of CPqAM for technical assistance. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We are thankful to Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

REFERENCES

- Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vogler, A.J., Wagner, D.M., Allender, C.J., Easterday, W.R., Chenal-Francois, V., and Keim, P. (2004) Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17837-17842.
- Adair, D.M., Worsham, P.L., Hill, K.K., Klevytska, A.M., Jackson, P.J., Friedlander, A.M. and Keim, P. (2000) Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* **38**, 1516-1519.
- Almeida, A.M.P., Brasil, D.P., Leal, N.C., Melo, M.E.B., Rego, R.V.B. and Almeida, C.R. (1989) Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **84**, 249-256.
- Almeida, A.M.P., Brasil, D.P., Carvalho, F.G. and Almeida, C.R. (1985) Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Rev Inst Med trop São Paulo* **27**, 207-218.
- Almeida, A.M.P., Leal-Balbino, T.C., Sobreira, M. and Leal, N.C. (2007) La peste au Brésil: son evolution jusqu'a nos jours. In *Peste: entre épidémies et sociétés* ed. Signoli, M., Chev e, D., Adalian, P., Bo tsch, G. and Dutour, O. pp. 259-264. Firenze: Firenze University Press.

- Altschul, S.F., Maden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Baltazard, M. (1968a) Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Rev Bras Malariol D Trop* **20**, 367-370.
- Baltazard, M. Pesquisas sobre a peste no Brasil (1968b) Terceiro relatório. *Rev Bras Malariol D Trop* **20**, 371-390.
- Benson, G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **5**, 573-580.
- Bionformatics Toolbox: Ferramenta computacional - .Seqtool. [s.l.,s.n., s.d].
<http://www.seqtool.dk> >. Accessed February 2007
- Cui, Y., Li, Y., Gorgé, O., Platonov, M.E., Yan, Y., Guo, Z., Pourcel, C., Dentovskaya, S.V., Balakhonov, S.V., Wang, X., Song, Y., Anisimov, A.P., Vergnaud, G., Yang, R. (2008) Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Plos one* **3**, 2652.
- Girard, J.M., Wagner, D.M., Vogler, A.J., Keys, C., Allender, C.J., Drickamer, L.C. and Keim, P. (2004) Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8408-8413.
- Hall, T.A. (1999) Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows. *Nucleic Acids SympSer* **41**, 95-98.
- Hamming, R. (1950) Error-detecting and error-correcting codes. *Bell System Technical Journal* **29**, 147-160.
- Karimi, Y. (1978) Rapid laboratory diagnosis of plague. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **71**, 45-48.

- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J. and Hugh-Jones, M.E. (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**, 2928-2936.
- Klevytska, A.M., Price, L.B., Schupp, J.M., Worsham, P.L., Wong, J. and Keim, P. (2001) Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol* **39**, 3179-3185.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinf* **9**, 299-306.
- Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Nascimento, M.G.M., Oliveira, M.B.M., Balbino, V.Q. and Almeida, A.M.P. (2006) The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genet Mol Biol* **29**, 126-131.
- Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Lopes, C.V. and Almeida, A.M. (2004) Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 727-732.
- Leal, N.C., Sobreira, M., Leal, T.C.A. and Almeida, A.M.P. (2000) Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis*. *Braz J Microbiol* **31**, 20-24.
- Le Flèche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramiisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramiisse, F. and Vergnaud, G. (2001) A tandem repeats database of bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* **1**, 2.

- Lowell, J.L., Wagner, D.M., Atshabar, B., Antolin, M.F., Vogler, A.J., Keim, P., Chu, M.C. and Gage, K.L. (2005) Identifying sources of human exposure to plague. *J Clin Microbiol* **43**, 650-656.
- Pourcel, C., André-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramisse, F., Vergnaud, G. (2004) Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbio* **8**, 4-22.
- Sneath, P.H. and Sokal, R.R. (1962) Numerical taxonomy. *Nature* **193**, 855-860.
- Souza, G., Abath, F., Leal, N., Farias, A. and Almeida, A. (2007) Development and evaluation of a Single Tube Nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. In *The Genus Yersinia: From Genomics to Function* ed. Perry, R.D. and Fetherston, J.D. pp. 351-359. New York: Springer.

APÊNDICE B – Normas editoriais da revista Letters in Applied Microbiology
(ISSN: 1364-5072)



Letters in Applied Microbiology

Part of Journal of Applied Microbiology, the Official Journal of the Society for Applied Microbiology

[Published on behalf of the Society for Applied Microbiology](#)

Edited by:

J.-Y. Maillard

Print ISSN: 0266-8254

Online ISSN: 1472-765X

Frequency: Monthly

Current Volume: 48 / 2009

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 86/138 (Biotechnology & Applied Microbiology); 62/94 (Microbiology)

Impact Factor: 1.623

Did you know... Letters in Applied Microbiology has no page charges? Please note that these author guidelines have been updated recently. It is recommended that all authors check the guidelines thoroughly even if they have previously submitted an article to this journal.... Quick Links...

Manuscript submission: <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology> Editorial Office: lam@wiley.com Production Office: lam-proofs@wiley.com Electronic Graphics: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> Exclusive Licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/lam_caf.pdf Colourwork Agreement form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

The preparation and presentation of manuscripts Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in Letters is at a premium, individual papers have a limit of approximately 4000 words, including figures and tables (N.B. a half page figure is equivalent to 450 words). The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity via plagiarism detection software or related applications. Format of papers Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off. The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs. Submissions Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice. Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Managing Editor lam@wiley.com. A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

1. Full-length papers The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted. The paper will have the following sections: (a) ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added; (b) INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject; (c) MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available at <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>); (d) RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study; (e) DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section; (f) ACKNOWLEDGEMENTS; and (g) REFERENCES: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date. Layout of references The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). The following is an example of order and style to be used in the manuscript: Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. Lett Appl Microbiol 39, 127-135. Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office. Fricker, C.R. (1995) Detection of Cryptosporidium and Giardia in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry. Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals. English usage Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. Headings The hierarchy of the headings used is: First Order MATERIALS AND METHODS Second Order Sample preparation Third Order The media. First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented. Abbreviations and units The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bj12a.htm. Microbial nomenclature The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. Pseudomonas, Proteus, Pedicoccus, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (Corynebacterium diphtheriae subsp. mitis; groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. Staphylococcus aureus group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae). The nomenclature used when describing the species of Salmonella should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word 'serotype' and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalized (for example Salmonella serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example Salm. Typhimurium). Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names: Acet., Acetobacter; Ac., Acinetobacter; Act., Actinomyces; Aer., Aeromonas; Ag., Agrobacterium; Alc., Alcaligenes; Alt., Alteromonas; B., Bacillus; Bact., Bacteroides; Bord., Bordetella; Bran., Branhamella; Br., Brucella; Camp., Campylobacter; Cit., Citrobacter; Cl., Clostridium; Coryne., Corynebacterium; Cyt., Cytophaga; Des., Desulfomonas or Desulfovibrio (spell out if both appear in same paper); Edw., Edwardsiella; Ent., Enterobacter or Enterococcus (spell out if both appear in same paper); Erw., Erwinia; E., Escherichia; Eu., Eubacterium; Fl., Flavobacterium; Fus., Fusobacterium; G., Gemella; H., Haemophilus; Kl., Klebsiella; Lact., Lactobacillus; L., Lactococcus; Leg., Legionella; Leuc., Leuconostoc; L., Listeria; Meth., Methanobacterium or Methanococcus (spell out if both appear in same

paper); Mic., Microbacterium; M., Micrococcus; Mor., Moraxella; Myco., Mycobacterium; Myc., Mycoplasma; N., Neisseria; Nit., Nitrobacter or Nitrosomonas (spell out if both appear in same paper); Noc., Nocardia; Past., Pasteurella; Ped., Pediococcus; Ple., Plesiomonas; Pr., Proteus; Ps., Pseudomonas; Rh., Rhizobium; R., Ruminococcus; Salm., Salmonella; Ser., Serratia; Sh., Shigella; Staph., Staphylococcus; Strep., Streptococcus; S., Streptomyces; T., Thiobacillus; V., Vibrio; X., Xanthomonas; Y., Yersinia. For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp In this, many species names not included in the Approved Lists (www-sv.cict.fr/bacterio) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered. Nucleotide sequences (1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript; (2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information; (3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure. Statistics Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold. Tables Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of LAM table style, [click here](#). Figures Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of LAM figure style, [click here](#). Photographs. These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures. Electronic submission. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> Colour figures. Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf and should be sent to the Editorial Office on acceptance. Footnotes Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence. Experimental hazards Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'. Ethics of experimentation The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example in vitro biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should

be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. Gnotobiotic animals The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. Germ-free implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. Conventional animals have a full complement of associated microbes. Open conventional animals are housed in a standard animal house. Isolator conventional animals are maintained in isolators and associated with full flora. Ex-germ-free animals are those with an associated flora which have become conventional. Supplementary material Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

2. Review Articles Preparation of manuscript These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available. The final manuscript must not exceed 4000 words with double-spaced typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only. Manuscript presentation The headings in these review articles are of the author's choice. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running title not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and e-mail address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs. A short SUMMARY of 150-200 words must be included, as well as an INTRODUCTION, DISCUSSION, CONCLUSION (possibly referring to future prospects) sections. References must be chosen carefully as their number is limited by the size limitation of the review article.

3. Letters to the Editor The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

4. Notes to the editor

The Chief Editor will consider notes which will provide further confirmatory information on a particular topic, or a novel aspect of a methodology (e.g. detection) or a micro-organism (e.g. virulence factor) for which results are preliminary but the impact for Applied Microbiology deemed to be important and requires rapid publishing. Notes should be concise (2000 words; including references), with no headings and present results in 1 table or 1 figure only. Proofs The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately. Offprints A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. Exclusive licence Papers are accepted on the understanding that Letters is granted exclusive licence to publish them. Online Open Online Open is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each Online Open article will be subject to a one-off fee of \$3000, excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as Online Open and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy. Any authors wishing to send their paper Online Open will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/LAM_OOF.pdf

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s)Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

Author material archive policyPlease note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor. Abbreviations These are some examples of common abbreviations used in Letters in Applied Microbiology: A, Absorbanceapprox. or c., approximatelyat. wt., atomic weightbp, base pairsby vol, by volume (for greater than two component liquids)cm², per square centimetrecpDNA, chloroplast DNAD, attenuance (see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html> Da (kDa), daltons (kilodaltons)edn, editioned., editor(s)ergs. sq. mm⁻¹, ergs per square millimetreIU, International unitkbp, kilobase pairMabs, monoclonal antibodiesMIC, minimal inhibitory concentrationmol l⁻¹, moles per litreMr, molecular massnm, nanometre OD, optical densityOFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresisORF or orf, open reading frameP, probabilityPFG, pulsed field gradientppm, parts per millionrecDNA, recombinant DNArev min⁻¹, revolution per minuteSD, standard deviationSE, standard errorsubsp., subspeciesU, enzyme unitUV, ultravioletvs, versusv/v, volume per volumew/v, weight per volumew/w, weight per weight There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, HPLC, RNA or SDS-PAGE.

OnlineEarlyLetters in Applied Microbiology is covered by Blackwell Publishing's OnlineEarly service. OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. OnlineEarly articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of OnlineEarly articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so OnlineEarly articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

DisclaimerWhilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive Licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/lam_caf.pdf Colourwork Agreement form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

Note to NIH GranteesPursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)