



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



Maria Paloma Silva de Barros

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE
CAMPO PULSADO (PFGE) PARA TIPAGEM
MOLECULAR DAS CEPAS DE *Yersinia
pestis* ISOLADAS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

RECIFE
2007

Maria Paloma Silva de Barros

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE
CAMPO PULSADO (PFGE) PARA TIPAGEM MOLECULAR DAS CEPAS DE
Yersinia pestis ISOLADAS NO NORDESTE BRASILEIRO**

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

Orientadora: Dr^a Tereza Cristina Leal Balbino
Co-Orientadora: Dr^a Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife
2007

Maria Paloma Silva de Barros

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE
CAMPO PULSADO (PFGE) PARA TIPAGEM MOLECULAR DAS CEPAS DE
Yersinia pestis ISOLADAS NO NORDESTE BRASILEIRO**

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

Aprovado em: 02/05/2007

Banca Examinadora

Dra. Tereza Cristina Leal Albino
CPqAM/FIOCRUZ (Orientadora)

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
CPqAM/FIOCRUZ (Co-Orientadora)

Dra. Valéria Rego Alves Pereira
CPqAM/FIOCRUZ (Membro Interno Titular)

Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira
UFRPE (Membro Externo Titular)

Dr. Luis Carlos Alves
CPqAM/FIOCRUZ (Membro Interno Suplente)

Dr. Valdir de Queiroz Albino
UFPE (Membro Externo Suplente)

**"Há pessoas que transformam o sol
numa simples mancha amarela,
mas há também aquelas
que fazem de uma simples mancha amarela
o próprio sol" (Pablo Picasso).
Mamãe, dedico a você!**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao nosso PAI MAIOR pela esperança e fé.

A minha mãe, tão presente como o amanhecer do sol, dando-me força e coragem em todos os momentos. Serei eternamente grata.

Ao meu amor, por está ao meu lado, acompanhando-me, não deixando, por nenhum momento, sentir-me sozinha.

As minhas irmamigas, Carol e Ciana. Obrigada, minhas queridas, pelas palavras de conforto, de alegria, de compreensão e de amizade.

A minha amiga e orientadora, Dra Tereza Cristina, Cris, pelo companheirismo, pela dedicação e por acreditar em mim e no nosso trabalho com o PFGE. Meus sinceros agradecimentos.

A Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida, pela atenção e ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu amigo Vladimir, companheiro de luta, de alegrias, angústias e conquista pela padronização de nossa técnica. Obrigadão por tudo.

Aos meus amigos do Mestrado, por todos os momentos de angústias, dúvidas e alegrias. Principalmente, minhas amigas e companheiras de trabalho de sala de aula, Carina e Bruna, obrigada pela sincera amizade e pela paciência.

A minha amiga, Rossany Holanda, sua ajuda foi de suma importância para a realização deste trabalho, obrigada.

A todos do laboratório de Microbiologia, sem vocês não adiantaria tanto sacrifício.

Agradeço a Dra Valeira Rego, Dr Luis Carlos e Dr Valdir Balbino por aceitarem participar desta banca examinadora, principalmente, a Dra Maria Betânia Melo por ter sido a parecerista deste trabalho e minha amiga de laboratório.

Obrigada ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e aos Departamentos de Saúde Coletiva e Microbiologia pelo suporte técnico e científico.

Agradeço ao CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A *Yersinia pestis* é o agente causador da peste, doença infecciosa transmitida através da picada de pulgas infectadas. O homem se contamina acidentalmente ao entrar em contato com roedores ou outros animais infectados (raposas, cães e gatos) e suas pulgas. A *Y. pestis* é uma espécie muito homogênea, fenotipicamente, apresentando um sorotipo, um fagotipo e três biotipos. Diferentes métodos moleculares foram utilizados em estudos epidemiológicos para discriminar cepas bacterianas. No entanto, para *Y. pestis* isoladas em focos do Nordeste do Brasil, a maioria dos marcadores estudados não conseguiram discriminar as cepas originadas de diferentes hospedeiros, períodos e locais de isolamento. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é caracterizada pela separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão dos cromossomos com endonucleases de restrição. Essa técnica é considerada o padrão ouro dos métodos de tipagem molecular, sendo altamente discriminatória e válida para muitos patógenos bacterianos, inclusive *Y. pestis* de outros focos do mundo. O objetivo deste trabalho foi realizar tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* através do PFGE. Das 43 cepas de *Y. pestis*, 36 foram usadas para padronização da técnica e 22 cepas, obtidas antes e durante um surto de peste ocorrido no Estado da Paraíba, para avaliação do PFGE. De acordo com padrões encontrados com a endonuclease de restrição *Ascl*, 19 perfis foram gerados. Esses genótipos foram enquadrados em oito grupos (A-H) geneticamente relacionados. A técnica do PFGE mostrou-se capaz de diferenciar as cepas de *Y. pestis* obtidas em diferentes municípios, antes e durante o surto de peste. De acordo com a variabilidade dos padrões de restrição e o alto poder discriminatório, a técnica PFGE pode ser utilizada para diferenciação e análise de novos isolados. A padronização do protocolo do PFGE para genotipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis* pode ser útil na compreensão e controle da expansão da peste.

Palavras-chave: *Y. pestis*, tipagem molecular, PFGE

ABSTRACT

Yersinia pestis is the causing agent of plague, an infectious disease transmitted by infected fleas' bites. The men contaminate accidentally when get in contact with rodents or other infected animals (dogs, camels, cats and rabbits) and its fleas. *Y. pestis* is a very homogeneous species, phenotypically, presenting one serotype, one phage type, and three biovars. Different molecular methods had been used in bacterial epidemiology studies for discrimination strains. However, for *Y. pestis* isolated in focus of northeast of Brazil, most of the markers had not succeed in discriminating strains from different hosts, periods and places of isolation. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is characterized by the separation of DNA fragments upon digestion of the chromosome with restriction endonucleases. This technique is considered the "gold standard" of the methods of molecular typing, being highly discriminatory and useful for many bacterial pathogen, including *Y. pestis* from other foci of the world. The objective of this work was to perform a genotyping of Brazilian strains of *Y. pestis* through the PFGE. Out of 43 *Y. pestis* strains, 36 had been used for the standardization of the technique and 22 strains which have been obtained before and during a plague outbreak occurred in the State of Paraíba, 36 were for evaluation of the PFGE. According to the patterns found with the restriction endonuclease *Ascl*, 19 profiles had been generated. These genotypes had been grouped into eight groups (A - H) genetically related. The PFGE technique proved to be able to differentiate strains of *Y. pestis* obtained from different counties, before and during the plague outbreak. According to the variability of the restriction patterns and the high discriminatory power, the PFGE technique can be used for differentiation and analysis of newly isolates. A standard PFGE protocol for genotyping Brazilian strains of *Y. pestis* can be useful in order to understand and control the expansion of plague in the country.

Keyword: *Y. pestis*, molecular typing, PFGE

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa dos focos de peste do Brasil.	4
Figura 2. Microscopia óptica da bactéria <i>Yersinia pestis</i> em tecido sangüíneo corada pela técnica de Wayson.	7
Figura 3. Ciclo epidemiológico da peste.	11
Figura 4. Esquema representativo do genoma da <i>Y. pestis</i> .	17
Figura 5. Esquema representativo da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).	25
Figura 6. Características de crescimento e lise da <i>Y. pestis</i> .	33
Figura 7. PFGE em gel a 1% de agarose <i>Seakem Gold</i> em tampão TBE 0,5X, clivado com a enzima <i>Ascl</i> e realizada no sistema CHEF III sob voltagem de 4,5V/cm a 14°C por 21 horas.	42
Figura 8. Dendrograma gerado pela análise do PFGE usando o Dice/UPGMA (Bionumerics / Applied Maths).	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação dos biovars das cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	7
Tabela 2. Características das cepas de <i>Y. pestis</i> estudadas.	32
Tabela 3. Classificação dos padrões PFGE desenvolvido por Tenover et al. (1995).	37
Tabela 4. Características das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas antes e durante um surto de peste no Estado da Paraíba analisadas pelo PFGE.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAB	<i>Blood Agar Base</i>
BHI	<i>Brain Heart infusion Broth</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
CSB	Tampão de Suspensão Celular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
F1	Fração 1
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
Fur	<i>Ferric Uptake Regulation</i>
HA	Hemaglutinação
HPI	Ilha de Patogenicidade
IS	Seqüência de Inserção
Kb	Kilobase
mg	miligrama
ml	mililitro
MLVA	Análise dos VNTR
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente
RFLP	Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
rRNA	RNA ribossomal
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
SNP	Serviço Nacional de peste
SRP	Serviço de referência em peste

SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
TBE	Tris-botrato, ácido bórico, EDTA
TE	Tris:EDTA
UV	Ultra Violeta
VNTR	Número Variável das Repetições em Tandem
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde
YadA	<i>Yersinia adhesin</i>
Yops	<i>Yersinia outer membrane protein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da peste	1
1.2 Peste no Brasil	2
1.3 Descrição da peste	4
1.4 Epidemiologia da peste	5
1.4.1 Distribuição	5
1.4.2 Etiologia	5
1.4.3 Formas Clínicas	7
1.4.4 Modo de Transmissão	9
1.5 Diagnóstico da peste	11
1.5.1 Diagnóstico Bacteriológico	12
1.5.2 Diagnóstico Sorológico	12
1.5.3 Diagnóstico Molecular	13
1.6 Tratamento da peste	13
1.7 Vigilância e Controle da peste no Brasil	14
1.8 Medidas Preventivas	15
1.9 Característica de Patogenicidade da <i>Y. pestis</i>	16
1.9.1 Genoma da <i>Y. pestis</i>	16
1.9.2 Ilha de patogenicidade (HPI)	17
1.9.3 Plasmídios de <i>Y. pestis</i>	19
1.9.4 Características Evolutivas da <i>Y. pestis</i>	20
1.10 Estudo Epidemiológico Molecular	21
2 JUSTIFICATIVA	26
3 PERGUNTA CONDUTORA	28
4 HIPÓTESE	29
5 OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo Geral	30
5.2 Objetivos Específicos	30
6 MATERIAIS E MÉTODOS	31
6.1 Cepas de <i>Y. pestis</i> e condições de crescimento	31
6.2 Teste com o bacteriófago	31

6.3 Padronização da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado – Sistema PFGE para tipagem molecular de cepas brasileiras de <i>Y. pestis</i>	33
6.3.1 Preparação dos blocos de agarose (<i>plugs</i>) a partir de cultivo em Agar	33
6.3.2 Lise celular nos <i>plugs</i> de agarose	34
6.3.3 Lavagem dos <i>plugs</i> após lise celular	34
6.3.4 Digestão do DNA nos <i>plugs</i> de agarose com endonucleases de restrição	34
6.3.5 Lavagens dos <i>plugs</i> de agarose após a digestão com as endonucleases de restrição	35
6.3.6 Montagem do gel de agarose	35
6.3.7 Condições de eletroforese usando o sistema CHEF DR III (Bio-Rad)	35
6.3.8 Coloração e documentação do gel de agarose	36
6.3.9 Análise dos dados do PFGE	36
6.3.10 Determinação do Índice Numérico de Discriminação (D)	36
7 RESULTADOS	38
7.1 Padronização do sistema PFGE	38
7.1.1 Suspensão, Lise Celular e Lavagem dos <i>plugs</i>	38
7.1.2 Digestão do DNA nos <i>plugs</i> de agarose com endonucleases de restrição	38
7.1.3 Eletroforese usando o sistema CHEF DR III (Bio-Rad)	39
7.2 Avaliação do sistema PFGE na Tipagem Molecular das cepas brasileiras de <i>Y. pestis</i>	39
8 DISCUSSÃO	45
9 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A - Artigo Científico	60

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Peste

A história da peste é muitas vezes confundida com o próprio registro histórico da humanidade. Existem numerosas referências à peste em textos antigos, incluindo o Antigo Testamento. O primeiro registro de uma epidemia de peste ocorreu em Atenas, em 430 a.C., durante a guerra do Peloponeso, e dizimou uma população estimada em 300.000 pessoas (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

Durante a era cristã, foram bem caracterizadas três grandes pandemias: Um grande surto de peste que ocorreu entre os anos de 542-602 d.C., sendo considerado como a primeira grande pandemia, também denominada de Pandemia Justiniana. Iniciando no Egito, disseminou-se por todo o mundo civilizado, atingindo Ásia, África e Europa com alta letalidade (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

Os primeiros casos da segunda grande pandemia iniciaram na Ásia e se estenderam por toda Europa e Norte da África. Esta pandemia, também foi conhecida como Peste Negra, ocorrendo de 1347-1353, expandindo-se pela Ásia, África e Europa. A sua principal forma clínica foi à pneumônica, forma gravíssima da peste, que dizimou mais de 25 milhões de pessoas na Europa (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

A terceira pandemia ou Pandemia Contemporânea originou-se provavelmente na Mongólia, estendeu-se para Hong Kong e Cãnon em 1894, e de lá se expandiu, através do transporte marítimo, para os Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Madagascar, (ALMEIDA et al., 2005; DRANCOURT; RAOULT, 2002). De acordo com Mollaret (1989), a expansão desta pandemia terminou com a Segunda Guerra Mundial, devido à substituição dos antigos navios pelos novos a prova de ratos. No entanto, esta pandemia deixou focos endêmicos em todos os continentes, exceto na Austrália. Durante esta pandemia, o bacilo da peste foi descoberto por Alexandre Yersin em junho de 1894.

Yersin descreveu a peste em Hong Kong e percebeu que 75% dos casos eram devido à peste bubônica e ainda relatou a relação entre ratos e peste. Paul

Louis Simon descobriu o papel da pulga do rato na transmissão da doença durante a epidemia na Índia em 1897 (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

A peste ainda permanece como um problema de saúde pública em alguns países e está classificada como uma doença reemergente devido ao aumento do número de casos relatados pela Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

1.2 Peste no Brasil

A peste chegou ao Brasil durante a última pandemia pelo porto de Santos em outubro de 1899, onde ocorreu o primeiro caso humano. Em seguida atingiu várias cidades litorâneas (peste portuária), e penetrou pelas cidades do interior (peste urbana) onde foi eliminada por medidas sanitárias adequadas, mas fixou-se na zona rural (peste silvestre) entre os roedores silvestres. A partir de 1930, passou a atingir áreas rurais, focos esparsos, pequenos distritos, fazendas e sítios, e finalmente assumindo o seu caráter de enzootia (ALMEIDA et al., 2005; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 1965).

Existem duas áreas principais de focos naturais de peste no país: o da região Nordeste e o foco da 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), Serra de Triunfo (Paraíba e Pernambuco), Planalto Oriental (Bahia), Chapada Diamantina (Bahia) e nordeste de Minas Gerais, fora do Polígono da Seca (Vale do Jequitinhonha e Vale do Rio Doce). O foco da Serra dos Órgãos abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, no Estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al., 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002) (Figura 1).

Os focos de peste do Nordeste do Brasil eram responsáveis, até meados da década de 80, por 20 a 100 casos anualmente, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. A partir de então, houve um decréscimo substancial do

registro de casos de peste. Os últimos eventos significativos de peste humana ocorreram nos estados do Ceará e Paraíba, nos anos de 1980. Durante a última década, alguns casos humanos suspeitos clínicos e epidemiológicos ainda foram notificados no Ceará e na Bahia. Contudo, somente três deles, ocorridos no Ceará, foram confirmados, dois por exame sorológico, em Guaraciaba do Norte, e um por isolamento da bactéria, em Ipu (ALMEIDA, 1985, 1989; ARAGÃO et al., 2002). Após oito anos de ausência de casos humanos no Brasil houve o registro de um caso de peste humana no Estado do Ceará, em fevereiro de 2005, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos.

Apesar da incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias no Brasil terem declinado nas áreas de foco do Nordeste, a atividade residual de peste tem sido detectada nos animais sentinelas (cães e gatos), exigindo uma atenção permanente dos focos (ARAGÃO et al., 2002; VIEIRA; COELHO, 1998).

Em Minas Gerais e no Rio de Janeiro não há notificação de casos humanos há décadas e é raro encontrar anticorpos antipestosos nos animais-sentinela (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; VIEIRA; COELHO, 1998).



Figura 1. Mapa dos focos de peste do Brasil.

Fonte: Almeida et al. (2005).

1.3 Descrição da peste

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

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA PESTE

1.4.1 Distribuição

A peste continua sendo uma ameaça em grandes 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, Índia e sudeste da Europa, com focos na Federação Russa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

Durante os últimos 14 anos 38.359 casos foram notificados em 25 países com 2.845 mortes. Em 2002 foram notificados 1.925 casos de peste humana em 13 países, com um total de 177 óbitos. Ocorreram na África 1.822 casos sendo 171 fatais; na Ásia, 99 casos com seis óbitos e nas Américas quatro casos com todos os pacientes curados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

Em 2003, nove países notificaram 2.118 casos, incluindo 182 mortes, sendo a África o continente mais atingido, com 2.091 casos e 180 mortes, seguido da Ásia com 26 casos e duas mortes e Américas com um caso curado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

Durante 1990-2005, um total de 107 casos de peste foi registrado nos EUA, uma média de sete casos por ano. 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 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006).

1.4.2 Etiologia

A *Y. pestis* é o agente causador da peste, pertencente à família Enterobacteriaceae. O gênero *Yersinia* compreende 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*. Além da *Y. pestis*, as espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* também são patogênicas para o homem e animais (PERRY; FETHERSTON, 1997).

A *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são enteropatogênicas, transmitidas pela via oral-fecal e promovem 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).

A *Y. pestis* se apresenta em microscopia óptica como um bacilo gram-negativo, curto, ovóide (0,5 a 0,8 µm de diâmetro e de 1 a 3µm de comprimento), não forma esporos e de coloração bipolar com giemsa, caracterizada por extremidades escuras (Figura 2). É uma bactéria aeróbia ou anaeróbica facultativa, cresce bem em meios usuais a 28°C, pH entre 5 e 9, porém resistente ao frio, conservando-se por longo tempo em cadáveres e também nos dejetos de pulgas (PERRY; FETHERSTON, 1997). As cepas de *Y. pestis*, são muito homogêneas fenotipicamente, caracterizando-se por apresentar um sorotipo, um fagotipo e três biotipos ou biovars definidos pela capacidade em fermentar o glicerol e reduzir nitratos a nitritos. Os biovars foram associados às três últimas pandemias e classificadas segundo Devignat (1953). Esses biovars não diferem quanto ao nível de patogenicidade, nem à forma clínica da doença (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Uma cepa denominada *Microtus*, isolada na China, foi considerada um novo biovar por não utilizar o açúcar arabinose, diferente das outras cepas de *Y. pestis* (ZHOU et al., 2004). Baseado na habilidade de fermentar glicerol e arabinose e reduzir nitrato, a *Y. pestis* foi classificada em quatro biovars: *Antiqua* (glicerol +, arabinose + e nitrato +); *Medievalis* (glicerol +, arabinose + e nitrato -); *Orientalis* (glicerol -, arabinose + e nitrato +) e *Microtus* (glicerol +, arabinose - e nitrato -) (Tabela 1).

O biovar *Microtus* é avirulento para humanos, embora ocorram epizootias de peste todo ano na região de isolamento da cepa (ZHOU et al., 2004). Análises por microarranjos e PCR nos dois focos relacionados a esta cepa demonstraram deleções de genes, específicos da cepa *Microtus*, que podem estar associados à atenuação da cepa para humanos. A deleção de 122pb no gene *araC* pode levar ao fenótipo arabinose negativa das cepas biovar *Microtus*, uma deleção de 93pb no gene *glpD* resulta na característica glicerol negativa em cepas do biovar *Orientalis* e

dois tipos de mutações pontuais no gene *napA* podem ocasionar a ineficiência de reduzir nitrato no biovar *Medievalis* e *Microtus* (ZHOU et al., 2004), tabela 1.

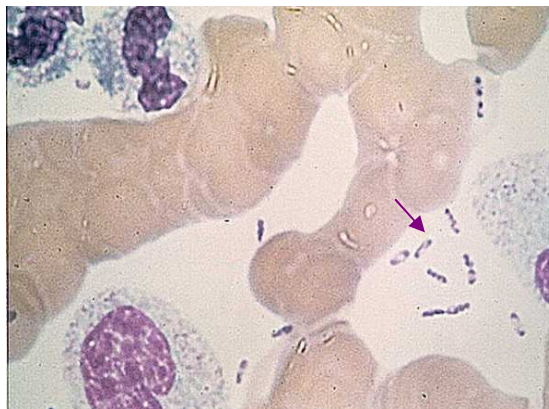


Figura 2. Microscopia óptica da bactéria *Yersinia pestis* (seta) em tecido sangüíneo corada pela técnica de Wayson.

Fonte: <http://www.cdc.gov>

Tabela 1. Classificação dos biovars das cepas de *Yersinia pestis*.

Biovar	REAÇÃO BIOQUÍMICA			Distribuição Geográfica
	<i>Nitrato</i>	Glicerol	Arabinose	
Antiqua	+	+	+	África, China Rússia
Medievalis	-	+	+	
Orientalis	+	-	+	Ásia, África e América China
Microtus	-	+	-	

1.4.3 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 prevalente, correspondendo a 98% dos casos ocorridos no Nordeste do Brasil e se caracteriza pela presença de um bubão (tumefação dos linfonodos) na região próxima da picada da pulga, acompanhada de

febre alta. O bubão aparece no segundo ou terceiro dia, resultado da inflamação aguda dos linfonodos que drenam a área de inoculação do bacilo, sendo extremamente doloroso. Quando a picada da pulga ocorre nas regiões superiores surgem nódulos axilares ou cervicais, quando acontece nos membros inferiores formam-se nódulos inguinais ou femurais (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; DENNIS et al., 1999). A sintomatologia é identificada por: calafrios, cefaléia, febre, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos e dores generalizadas. O período de incubação é de dois a seis dias, porém, em alguns casos é mais rápido.

A peste pneumônica é considerada a forma mais grave e perigosa, pelo alto grau de contágio e conseqüente capacidade de provocar epidemias. Podendo ser secundária à bubônica ou septicêmica por disseminação hematogênica, ou 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. Esta forma clínica 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 e 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 (ALMEIDA et al., 2005).

A peste septicêmica geralmente aparece na fase terminal da peste bubônica não tratada. É pouco freqüente e geralmente não há reações ganglionares visíveis, é caracterizada pela presença do bacilo no sangue. Clinicamente, a peste septicêmica assemelha-se às septicemias causadas por outras bactérias gram-negativas. Apresenta um quadro clínico com abrupta elevação térmica, calafrios, arritmia, hipotensão, náuseas, vômitos, astenia e perturbação mental. Essa forma tem um alto grau de letalidade quando não tratada (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Além dessas formas graves, existe uma forma benigna ou ambulatorial, denominada peste benigna ou "pestis minor", com discreto comprometimento ganglionar, febre baixa e cura espontânea (ALMEIDA et al., 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

1.4.4 Modo de transmissão

A persistência da peste nos focos naturais reside na sua complexa epidemiologia. A peste é primordialmente uma zoonose de roedores e sua transmissão ocorre principalmente pela picada de pulgas infectadas, podendo infectar outros animais (coelhos, camelos, cães e gatos). O homem contamina-se acidentalmente ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas (ALMEIDA et al., 2005; PERRY; FETHERSTON, 1997) (Figura 3).

Na peste pneumônica, as gotículas transportadas pelo ar e os fômites de pacientes são a forma de transmissão mais freqüente de pessoa a pessoa. Tecidos de animais infectados, fezes de pulgas, culturas de laboratório também são fontes de contaminação (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A principal fonte de infecção da peste, na natureza, são os roedores e estima-se que cerca de 200 espécies estejam envolvidas no ciclo epidemiológico. Cada foco pode apresentar uma fauna distinta. No Brasil, os principais roedores relacionados ao ciclo epidemiológico da peste pertencem aos gêneros: *Bolomys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Galea* (preás), *Trychomys* (punarés) e *Rattus rattus* (*Rattus*). Alguns são mais resistentes a doença como o *Galea* e *R. rattus*, enquanto outros, como os *Bolomys*, são mais sensíveis, passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção (ALMEIDA et al., 2005).

A picada de pulgas é o principal mecanismo de transmissão da doença (Figura 3). O artrópode ingere o sangue do hospedeiro bacteriêmico e o bacilo se multiplica no seu estômago, preenchendo a parte anterior do canal intestinal, o proventrículo, determinando bloqueios que levarão a morte. Ao mesmo tempo as pulgas bloqueadas são altamente infectantes, pois ao tentarem se alimentar novamente fazem grande esforço para sugar, provocando regurgitação do conteúdo do proventrículo e conseqüente inoculação da bactéria na corrente sanguínea do novo hospedeiro. A transmissão da bactéria pode ocorrer também através da introdução das bactérias contidas na probóscide das pulgas (ALMEIDA et al., 2005).

As pulgas são vetores reservatórios, pois podem transportar o bacilo no seu organismo por longo período e sobreviver nos roedores por vários meses. Como nos roedores, cada região apresenta suas próprias pulgas. A *Xenopsylla cheopsis*, por

ter sido bastante pesquisada desde o século passado, é considerada o vetor clássico da peste e serve de referência para a avaliação da capacidade vetora de outras pulgas (POLLITZER, 1954).

Das 1200 espécies de pulgas conhecidas, 55 são encontradas no Brasil e as espécies *Polygenis bohlsi* e *P. tripus*, *X. cheopsis*, *Pulex irritans* e *Ctenocephalides felis* foram encontradas naturalmente infectadas pela *Y. pestis*. As *Polygenis* quando infectadas, transmitem a peste entre os roedores e podem ser encontradas, em vestuários ou livres nas moradias. Além disso, tem uma especial capacidade em picar o homem, responsáveis por numerosas infecções humanas, sendo considerada um sinal de alerta quando presente denunciando a ocorrência de atividade pestosa. A *P. irritans*, também encontrada nas pessoas, moradias e vestuários são responsáveis por casos secundários, quando um doente evolui com septicemia, havendo registro de detecção de espécimes infectados em vestuários de um indivíduo morto por peste, bem como livres no piso das casas, com ocorrência de casos secundários na família (ALMEIDA et al., 2005).

A transmissão entre humanos pode acontecer por aerossóis, por acidentes com tecidos e materiais contaminados em trabalho de campo ou laboratório, ou até na utilização da bactéria como agente de guerra biológica (GAGE; KOSOY, 2005).

A peste também pode ser transmitida de pessoa a pessoa se houver contato com o conteúdo do bubão e o líquido da seringa utilizada na punção, que poderá determinar a formação de aerossóis e ocorrência da peste pneumônica. Os casos humanos geralmente são precedidos por epizootias, mortandade de roedores sem causa aparente, que ocorrem sazonalmente. Com a morte do roedor infectado, as pulgas abandonam os cadáveres e buscam um novo hospedeiro, parasitando outros animais e o homem (ALMEIDA et al., 2005).

Normalmente essa transmissão coincide com a época da colheita, ao armazenamento dos produtos no interior das moradias, a criação de logomorfos e roedores na casa, as precárias condições de higiene nas casas e a precariedade da qualidade dos serviços de saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Em relação aos animais de estimação, por seu contato com o homem e sua condição de predador, cães e gatos são de importância no ciclo da peste, pois podem carrear pulgas infectadas pela *Y. pestis*, como também desenvolver a infecção. Os cães habitualmente não expressam manifestações clínicas, mas os gatos podem apresentar as formas ganglionar, faríngea e a pneumônica, que os

tornam perigosos, pois podem determinar casos de peste em humanos (Figura 3). Sobrevivendo produzem anticorpos específicos, durante até um ano, que tornam as duas espécies importantes para vigilância epidemiológica, na condição de animais-sentinela, contribuindo para pesquisa nos focos visando à detecção precoce da atividade pestosa (DENNIS et al., 1999).

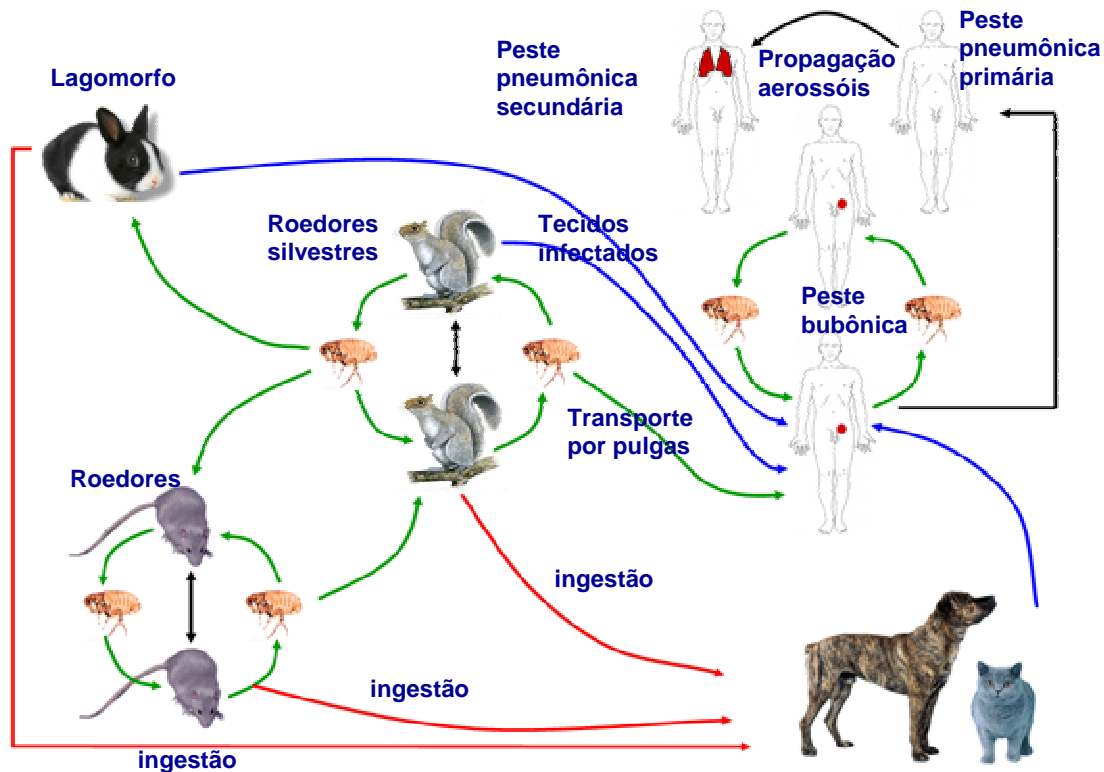


Figura 3. Ciclo epidemiológico da peste.

1.5 Diagnóstico da peste

Tradicionalmente são realizadas bacterioscopia, culturas, inoculação em animais de laboratório e provas bioquímicas com material colhido do bubão, escarro, sangue, medula óssea e fragmentos de vísceras (fígado, baço, glândulas linfáticas) para diagnóstico da peste. O isolamento é considerado o padrão ouro para confirmação da infecção pestosa, mas nem sempre as amostras procedentes de casos humanos são adequadas. Desta forma, exames sorológicos são realizados. 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).

A necropsia de mortes suspeita é realizada e autorizada pelo regulamento Sanitário Internacional. Até a sexta hora, colhe-se sangue de veia superficial do cadáver ou punciona-se bubão ou obtêm-se espécimes do pulmão, cérebro, fígado e medula óssea. A digitectomia é realizada quando o corpo está em decomposição até o 20^o dia, que consiste na amputação do dedo para exame bacteriológico de rotina, pois o bacilo se conserva na medula óssea por longo tempo (ALMEIDA et al., 2005).

O Serviço de Referência em Peste do CPqAM tem padronizado métodos de diagnóstico molecular através da identificação de genes de virulência presentes nos três plasmídios e no cromossomo da *Y. pestis* a partir de pulgas, material de roedores ou humanos (LEAL et al., 1996; LEAL; ALMEIDA, 1999).

1.5.1 Diagnóstico Bacteriológico

As técnicas utilizadas para o diagnóstico bacteriológico por exame direto são: coloração pelo azul de metileno (Azul de Löffler), corante de Wayson, ou o método de Gram. As análises são realizadas utilizando esfregaços de fluido de bubão, amostras de sangue, medula e vísceras dos roedores (CHU, 2000).

Para identificação da *Y. pestis* as amostras são cultivadas em duas placas de gelose (Blood Agar Base – BAB, Difco) a 28°C em pH na faixa de 7,4 a 7,6 por 48 horas. Depois do semeio adiciona-se uma gota do fago anti-pestoso específico em uma das placas. Após 48 horas de incubação as colônias apresentam tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante-translúcido e bordas inteiras. No ponto onde foi colocado o bacteriófago forma-se uma área de lise das colônias.

1.5.2 Diagnóstico Sorológico

Para o diagnóstico sorológico é utilizada a técnica de hemaglutinação (HA). Essa técnica utiliza hemáceas de carneiro sensibilizadas com o antígeno capsular

F1, da *Y. pestis*, que detecta anticorpos contra o antígeno F1 em soros humanos, de roedores e de carnívoros; e vem sendo usada em todos os focos do mundo, há várias décadas, no diagnóstico e vigilância da peste humana e em animais. Esta técnica apresenta algumas dificuldades: complexidade, emprego de reagentes perecíveis, baixa sensibilidade, etc. (ARAGÃO et al., 2002).

1.5.3 Diagnóstico Molecular

As técnicas moleculares permitem um diagnóstico rápido da peste e apresentam a vantagem de dispensar o cultivo das amostras para a execução da técnica, permitindo a realização mesmo quando as bactérias estão inviáveis. O diagnóstico molecular é uma alternativa a mais para o diagnóstico da peste através da identificação dos genes de virulência presentes nos três plasmídios prototípicos e no cromossomo da *Y. pestis*. Diversos protocolos baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e suas variações (Nested-PCR, Multiplex-PCR, Nested-PCRTbU, RT-PCR) tem sido desenvolvidos para o diagnóstico da peste em pulgas, material de roedores ou humanos (LEAL et al., 1996; LEAL; ALMEIDA, 1999; LOIEZ et al., 2003; SOUZA, 2005).

1.6 Tratamento da peste

O tratamento da peste deve ser precoce e intensivo dado a rapidez e gravidade da evolução da doença, visando deter a bacteriemia e superar a toxemia. A coleta de espécimes para os exames bacteriológicos deve ser realizada antes do uso do antimicrobiano, mas não se podem retardar os procedimentos a espera da confirmação laboratorial. O CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) recomenda que o paciente permaneça isolado durante as primeiras 48 horas do tratamento devido ao risco de pneumonia (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A *Y. pestis* é sensível à maioria dos antibióticos, com exceção da penicilina e derivados. A estreptomicina e gentamicina são eficazes na peste. A estreptomicina é considerada o padrão-ouro no tratamento da peste e é uma indicação formal no caso de pneumonia. Alguns autores recomendam a associação com a tetraciclina ou com o cloranfenicol, principalmente na pneumonia e meningite. A gentamicina é uma excelente opção terapêutica em quaisquer situações, sendo indicada para gestantes e crianças. A tetraciclina é o antimicrobiano de eleição no tratamento dos casos não complicados de peste. O cloranfenicol também é uma boa alternativa no tratamento da peste bubônica, septicêmica e pneumônica. Está indicado nos casos de meningites, pleurite, miocardite, onde alguns antimicrobianos não atingem níveis terapêuticos. As sulfonamidas são eficazes na prevenção e tratamento de casos não complicados, mas só devem ser usados quando outros antimicrobianos mais potentes não estiverem disponíveis (ALMEIDA et al., 2005).

A penicilina, cefalosporina, eritromicina, azitromicina são ineficazes “in vivo” contrariando os resultados dos antibiogramas e as indicações nas bulas. Estes antimicrobianos não devem ser prescritos para quimioterapia ou tratamento da peste, tendo em vista o risco do paciente evoluir para uma septicemia, pneumonia e morte (ALMEIDA et al., 2003).

Na última epidemia de peste em Madagascar, foi isolada uma cepa de *Y. pestis* com resistência aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da peste, como, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, além dos antimicrobianos alternativos, como a ampicilina, neomicina e minociclina, mas este fenômeno deve ser tratado com moderação. Esta resistência foi devido à aquisição de um plasmídeo que transporta os genes de resistência. Esta característica por ser plasmidial pode ser transmitida para outras cepas (GALIMAND et al., 1997).

1.7 Vigilância e Controle da peste no Brasil

O trabalho de controle da peste no Brasil esteve sob responsabilidade dos Departamentos de Saúde dos Estados e em 1936 passou à responsabilidade do Departamento Nacional de Saúde. Em 1941, foi criado o Serviço Nacional de Peste (SNP), estruturado especialmente para o combate dessa infecção em todo o

território, integrado sob comando único técnico e administrativo. A partir de 1956, o SNP passou a fazer parte do Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu), posteriormente SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública) e FUNASA (Fundação Nacional de Saúde).

Na década de 70 foi criada uma rede de laboratórios distribuídos estrategicamente nas áreas de peste, com atribuições em diferentes níveis. Foram divididos em laboratórios de apoio, que tinham a finalidade de coletar e preparar as amostras para exame, e laboratórios regionais encarregados de realizar diagnósticos laboratoriais.

Devido às reformas no Ministério da Saúde e reorganização do Sistema Nacional de Vigilância, o trabalho de controle da peste que vinha sendo realizado pela FUNASA, foi descentralizado, passando à responsabilidade aos próprios municípios atingidos por esta endemia, sob a coordenação da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS).

O Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), trabalha integralmente com a SVS e os municípios nesta vigilância.

As atividades de vigilância e controle envolvem a captura sistemática e exames bacteriológicos dos roedores e seus ectoparasitas, para detecção da *Y. pestis* e a pesquisa de anticorpos antipestosos através de inquéritos sorológicos entre roedores e carnívoros domésticos ou silvestres.

A modernização e desenvolvimento de estratégias de controle e métodos de diagnóstico rápidos são objetivos primordiais, assim como a sua utilização nas redes de laboratório de Saúde Pública, criando-se condições para que o Sistema Único de Saúde (SUS) dê respostas eficazes às demandas de rotina e mesmo a excepcionalidade de um ataque terrorista.

1.8 Medidas Preventivas

A vigilância epidemiológica da peste no Brasil está baseada no rastreamento da infecção nos campos, através da captura de roedores e suas pulgas e na pesquisa da *Y. pestis* nestas fontes, além da detecção de anticorpos antipestosos

circulantes em animais sentinelas (cães e gatos) e algumas espécies de roedores resistentes a infecção (*Rattus rattus*) (ALMEIDA et al., 2003).

O controle dos focos de peste é realizado pela eliminação das pulgas com inseticidas apropriados e a desratização e anti-ratização, destruição de abrigos e alimentação para roedores, nas áreas de peste endêmica (ALMEIDA et al., 2005).

A utilização de uma vacina é recomendável para indivíduos que estão continuamente expostos a 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 (DENNIS et al., 1999). Assim sendo, ela pode 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.

1.9 Características de Patogenicidade da *Y. pestis*

1.9.1 Genoma da *Y. pestis*

A virulência da *Y. pestis* é plurifatorial, visto que os fatores de virulência da *Y. pestis* são codificados no cromossomo de aproximadamente 4.650 kb e nos três plasmídios prototípicos: pPst ou pCP1 (\pm 9.5 Kb), pFra ou pMT1 (\pm 100 Kb) e pYV ou pCD1 (\pm 70 Kb) (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004) (Figura 4). 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 o genoma dessa bactéria sofreu grande fluxo gênico, constatado 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 pequeno tamanho do genoma bacteriano, a aquisição de genes pode ser contrabalanceada com a perda da atividade de outros, constituindo os

pseudogenes, encontrados com alta frequência no genoma das cepas de *Y. pestis* já seqüenciadas (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004).

No genoma da *Y. pestis* encontra-se também um elevado número de elementos ou seqüências de inserção (IS). Esses elementos são pequenas seqüências de DNA capazes de participar de rearranjos cromossômicos causando inserções, deleções e recombinações (HUANG et al., 2002; MOTIN et al., 2002).

Também existem, no seu genoma seqüências repetitivas, os denominados VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats* - número variável de repetições em tandem) classificadas como micro e minissatélites. Le Flèche et al. (2001) identificaram 63 minissatélites localizados no genoma dessa bactéria.

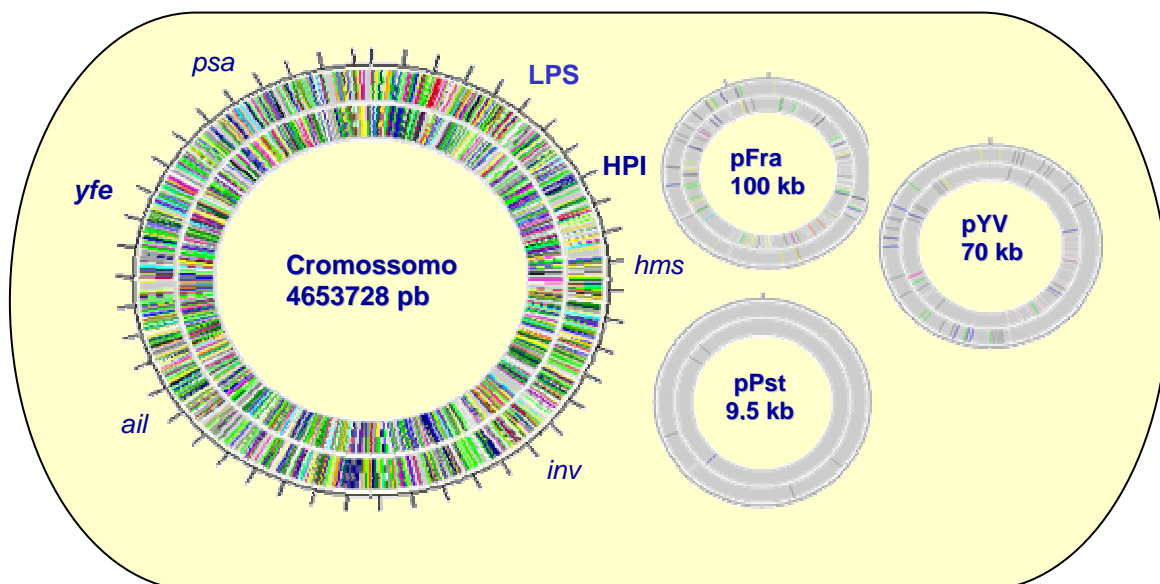


Figura 4. Esquema representativo do genoma da *Y. pestis*.

1.9.2 Ilha de patogenicidade (HPI)

No cromossomo das yersínias existe uma região de 102 kb conhecida como *locus pgm*, relacionada à virulência e a captação de ferro (FETHERSTON et al., 1992).

Várias características da *Y. pestis* foram associadas ao *locus pgm*, entre as quais se destacam: 1) capacidade de produzir um sideróforo yersiniabactina (Ybt); 2) habilidade da célula em absorver o pigmento Vermelho Congo e 3) possibilidade de

causar infecção letal nos animais em laboratório após injeção subcutânea. Este *locus* contém dois segmentos físico e funcionalmente distintos: um segmento de aquisição de ferro, considerado uma ilha de patogenicidade (HPI), que possui genes envolvidos na aquisição de ferro, e um segmento de pigmentação (*locus hms*) responsável pela estocagem do ferro evidenciado pelo fenótipo de pigmentação vermelho das colônias quando cultivadas em meios ricos em hemina ou corantes análogos, como o Vermelho Congo. Essa característica é explorada para identificação de cepas patogênicas que crescem no meio Agar Vermelho Congo com coloração vermelha, enquanto as cepas não patogênicas crescem com coloração branca (BUCHRIESER et al., 1998).

As ilhas de patogenicidade (HPI) são assim denominadas por apresentarem vários genes relacionados à patogenicidade. Apresentam um conteúdo GC (Guanina e Citosina) diferenciado do encontrado no restante do cromossomo do hospedeiro, sugerindo que se originaram de uma transferência horizontal entre diferentes gêneros bacterianos (HACKER et al., 1997).

O sistema Hms não é necessário para adesão ou invasão da *Y. pestis* em células eucarióticas. Este sistema está envolvido no bloqueio do proventrículo da pulga infectada e favorece a transmissão da peste para os mamíferos. Células Hms+ colonizam o proventrículo da pulga e são liberadas durante o repasto no hospedeiro, onde a bactéria rapidamente se multiplica estabelecendo a infecção. Mutantes Hms- sobrevivem e multiplicam-se rapidamente na pulga sem causar bloqueio do proventrículo e morte deste vetor (HINNEBUSH et al., 1996).

Em muitas bactérias, a regulação do ferro é mediada por um repressor altamente conservado denominado Fur (*ferric uptake regulation*) que age como um regulador negativo na transcrição na presença de ferro. O gene *fur* que codifica esta proteína está presente nas três yersínias patogênicas (STAGGS; PERRY, 1992).

1.9.3 Plasmídios de *Y. pestis*

Cepas atípicas, faltando algum plasmídio ou contendo plasmídios adicionais, têm sido encontradas em diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil (FILIPPOV et al., 1990; LEAL et al., 1997, 2000). Outras cepas isoladas em alguns

focos de peste apresentaram plasmídios crípticos (PERRY; FERTHERSTON, 1997) e a aquisição de plasmídios de resistência também foi relatada (GUIYOULE et al., 2001). Um plasmídio críptico de *Y. pestis*, apresentando um tamanho de 5,9 kb, chamado pYC, foi encontrado em cepas de *Y. pestis* isoladas na província de Yunnan na China (DONG et al., 2000).

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

O plasmídio pYV ou pCD1 é indispensável à virulência da *Y. pestis* e está presente nas outras espécies de *Yersinia* patogênicas: *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Este plasmídio apresenta cerca de 70kb e possui vários operons que codificam para diversas funções: genes relacionados com a dependência ao cálcio a 37°C, importante na inibição da fagocitose, interfere na resposta antiinflamatória e atrasa o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente (STRALEY et al., 1993).

Em todos os estudos realizados, o pYV tem mostrado ser, absolutamente, indispensável para virulência. A perda desta molécula resulta em avirulência completa em algumas yersínias patogênicas, inclusive a *Y. pestis* (BRUBAKER, 1983).

O plasmídio pPst ou pCP1 é específico da *Y. pestis* e tem cerca de 9,5 kb. Estão presentes no pPst: os genes da pesticina (*pst*), da proteína de imunidade a pesticina (*pim*) e o ativador do plasminogênio (*pla*) (SODEINDE; GOUGUEN, 1988; Sodeinde et al., 1988). Este plasmídio tem importância na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro, a partir do sítio da picada da pulga e no bloqueio do trato digestivo das pulgas (HINNEBUSH et al., 2003). O gene *pla* tem função proteolítica, adesiva e invasiva, que são importantes para a *Y. pestis* disseminar através da rota periférica de infecção (subcutânea ou picada da pulga). A pesticina é uma bacteriocina produzida pela *Y. pestis*. Essa bactéria é imune a pesticina, porque produz uma proteína de imunidade (*pim*) (BEN-GURION; HERTMAN, 1958; HU; BRUBAKER, 1974).

O pFra ou pMT1 tem o tamanho de 90-110 kb e é capaz de se integrar no cromossomo da *Y. pestis*, perdendo ou não as suas funções (LEAL-BALBINO et al., 2004; PROTSENKO et al., 1991). Esta integração se efetua, provavelmente, por

recombinação homóloga, entre seqüências de inserção presentes por todo o genoma da *Y. pestis*, tanto no cromossomo como nos plasmídios. Este plasmídio codifica uma proteína capsular ou fração F1, proteína altamente imunogênica (HUANG et al., 2006), que desempenha uma atividade antifagocítica (DU et al., 2002). Entretanto, a ausência da expressão do antígeno F1, em cepas de *Y. pestis* (ainda que tenham o pFra ou não) mostram ser virulentas (DROZDOV et al., 1995; WELKOS et al., 1995). E a toxina murina, *ymt*, parece estar envolvida na transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSCH, 2002).

O *ymt* não é necessário para virulência em camundongos, mas apresenta atividade de fosfolipaseD (*p/D*), que é necessária para sobrevivência da *Y. pestis* no intestino da pulga (Hinnebush et al., 2003). A atividade *p/D* parece proteger a *Y. pestis* no intestino da pulga contra a ação citotóxica do plasma. A aquisição do *ymt* e do *locus hms* (estocagem de ferro) contribuem para adaptação da *Y. pestis*, que a diferencia da *Y. pseudotuberculosis* (ZHOU et al., 2004).

1.9.4 Características Evolutivas da *Y. pestis*

A *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são muito semelhantes geneticamente, apresentando mais de 95% de semelhança quanto às seqüências dos genes cromossomais (LUCIER; BRUBAKER, 1992). Em decorrência das similaridades gênicas e antigênicas entre as duas espécies, foi proposto que fossem agrupadas numa única espécie, denominada de *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pestis*. No entanto, a proposta de reclassificação não foi implementada, devido à história e a considerações de segurança no laboratório que devem ser adotadas na manipulação da *Y. pestis* (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Achtman et al. (1999) analisaram cepas de *Y. pestis* e de duas outras yersínias patogênicas: *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Foram estudados fragmentos de cinco genes “housekeeping” e um gene envolvido na síntese de lipopolissacarídeos. Esses genes foram seqüenciados a partir de 36 cepas de *Y. pestis* e de 12-13 cepas de cada uma das outras espécies. Nenhuma diversidade nas seqüências dos genes de *Y. pestis* foi encontrada e estes alelos foram idênticos ou quase idênticos aos alelos de *Y. pseudotuberculosis*. Foi então concluído que *Y.*

pestis é um clone que evoluiu da *Y. pseudotuberculosis* a 1500-20000 anos atrás, um pouco antes da primeira pandemia conhecida de peste humana.

Embora existam semelhanças genéticas, as manifestações clínicas promovidas pelas duas espécies são nitidamente diferentes. Enquanto a *Y. pseudotuberculosis* causa transtornos entéricos raramente fatais e é transmitida exclusivamente pela via oral-fecal, a *Y. pestis* adquiriu a capacidade de ser transmitida por um artrópode-vetor (pulga) e pode ser letal (ACHTMAN, 1999, 2004).

Estas diferenças podem ser justificadas pela presença dos dois plasmídios específicos em *Y. pestis*, pFra e pYV, que podem ter sido adquiridos horizontalmente. Além da inativação de alguns genes nessa espécie como o *ail*, *inv* e *yadA*, não necessários para sobrevivência da *Y. pestis*, no entanto importantes para *Y. pseudotuberculosis*, na adesão e translocação da barreira intestinal (ACHTMAN, 1999, 2004).

1.10 Estudo Epidemiológico Molecular

Em estudos epidemiológicos é importante determinar a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença. A exata identificação do patógeno é requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre as populações estudadas (TENOVER et al., 1995).

Sistemas apropriados de tipagem são necessários para analisar a estrutura genética dos isolados bacterianos, permitindo estabelecer a relação entre eles e elaborar estratégias efetivas de controle epidemiológico (TENOVER et al., 1995).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para tipagem de bactérias patogênicas, que diferem quanto ao poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação (LINDSTEDT, 2005). A análise do poder discriminatório permite determinar quando um método de tipagem agrupa organismos dentro de poucos grupos ou quando dividem 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 das populações estudadas (TENOVER et al., 1995).

Diferentes técnicas moleculares têm sido empregadas para identificação e comparação de isolados bacterianos. Atualmente, a maioria destas técnicas se baseia na análise do DNA, algumas delas utilizam a PCR e suas variações, como RAPD, PCR-Ribotipagem, PCR-IS, MLVA, etc., importantes para a detecção de rearranjos de algumas regiões do genoma, monitoramento e distribuição dos patógenos (HUANG et al., 2002; LEAL et al., 1996; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2002).

O RAPD é baseado no polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente, que não depende do conhecimento prévio da seqüência do genoma do organismo a ser amplificada, não necessitando de *primers* direcionados a seqüências específicas do genoma. Envolve a utilização de um único *primer*, realizado em condições de baixa estringência, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos amplificados são resultantes do anelamento do *primer* com seqüências parcialmente homólogas do DNA molde ou de variações dos segmentos de DNA resultado de deleções ou inserções, modificando o tamanho das sequências de DNA (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAM et al., 1990).

A PCR-ribotipagem baseia-se na amplificação da região espaçadora dos genes ribossomais que codificam o rRNA 16S ou 23S. São construídos *primers* que anelam nesta região, gerando perfis que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos. Os genes ribossomais têm sido úteis na detecção do polimorfismo genético entre diferentes bactérias. Existem de 2 a 11 cópias do gene rRNA por célula bacteriana. A região espaçadora intergênica 16S-23S também codifica vários tRNA que favorece a diferenciação entre as bactérias (KOSTMAN et al., 1992).

As seqüências de inserção (IS) são também utilizadas nos estudos de tipagem molecular, pela capacidade de se inserir em múltiplos sítios de uma molécula alvo participando de rearranjos cromossômicos, causando inserções, deleções e recombinações (HUANG et al., 2002; MOTIN et al., 2002). Em todo genoma da *Y. pestis*, em cromossomos e plasmídios de virulência foram encontrados múltiplas cópias de IS, IS100 e IS285 (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004). Esses marcadores genéticos têm sido 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 – *variable number tandem repeat* (número variável de repetições em tandem), como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas (DE BENITO et al., 2004; LÊ FLECHE et al., 2001). Estudos dos VNTRs são realizados pelo MLVA (*Multiple locus variant repeat analysis* - Análise dos VNTRs) através da PCR e baseiam-se na identificação do polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados, como resultado dos eventos de inserção e deleção dentro do VNTR (DE BENITO et al., 2004; LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004).

Outro método utilizado na tipagem molecular é o PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado). Este método é considerado o padrão ouro dos métodos de tipagem molecular e baseia-se na separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão dos cromossomos com endonucleases de restrição, que cortam em grandes fragmentos (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992).

Na eletroforese em gel de campo pulsado utilizam-se campos elétricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção. Esta separação é baseada no maior tempo que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo do pulso (duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção) (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992).

A preparação das moléculas de DNA para a aplicação da técnica de PFGE envolve a imobilização das células numa matriz de agarose, de modo a evitar quebras não específica do DNA devido à agitação mecânica. A lise das células e a extração e purificação do DNA realiza-se com as células oclusas na matriz de agarose, seguindo-se a incubação com a enzima de restrição selecionada. Tem sido descritos vários equipamentos e geometrias de eletrodos de modo a melhorar a resolução dos perfis dos macrofragmentos gerados por este tipo de eletroforese (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992) (Figura 5).

Por ser uma técnica reprodutível e com bom poder discriminatório (poder este que pode ser aumentado pela utilização em simultâneo de várias enzimas que reconhecem sequências raras), tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos e na distinção de isolados clínicos das mais variadas espécies bacterianas, incluindo os membros da família Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Candida* spp dentre outros. Quando confrontado com informações epidemiológicas e outros métodos de tipagem, PFGE tem demonstrado um alto poder discriminatório, sendo comparável ou superior a outras técnicas disponíveis (OLIVE; BEAN, 1999; HUANG et al., 2002). No entanto, estudos com *Y. pestis* ainda são restritos.

A eletroforese em gel de campos alternados (PFGE) tem sido aplicada a uma ampla gama de microrganismos, entretanto, isolados não relacionados de alguns patógenos como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilina), *Haemophilus influenzae* tipo b, e *Escherichia coli* O157:H7, por representarem subgrupos geneticamente restritos, podem mostra-se indistinguíveis por PFGE. Perfis eletroforéticos indistinguíveis indicam a mesma origem clonal.

Perfis eletroforéticos com duas ou três bandas distintas indicam isolados estreitamente relacionados. Perfis eletroforéticos com quatro a seis bandas distintas indicam isolados possivelmente relacionados. Perfis eletroforéticos com sete ou mais bandas distintas indicam que os isolados não são relacionados. Os critérios interpretativos mais utilizados são os descritos por Tenover e colaboradores (1995).

As limitações do PFGE resultam do fato de ser uma técnica que exige experiência na sua aplicação, é dispendiosa e extensa, exige ainda equipamento específico para eletroforese de campo pulsado e enzimas de restrição que são aplicadas em elevada concentração.

Huang et al. (2002) realizaram uma investigação epidemiológica baseada na variabilidade genética de isolados dos Estados Unidos por PFGE e RFLP com sondas IS100 e IS285. Foram analisadas 37 cepas de *Y. pestis* com um único ribotipo, registrados entre 1939 e 1998 de pacientes, animais e pulgas. As 37 cepas foram divididas entre 26 padrões através do PFGE, 16 padrões através do RFLP com a sonda IS100 e quatro padrões com a sonda IS285. De todos os métodos que foram testados, o PFGE mostrou-se com maior grau de variabilidade, maior capacidade discriminatória entre as cepas estudadas e pode, conseqüentemente, melhorar os estudos epidemiológicos relacionados à origem de novas cepas.

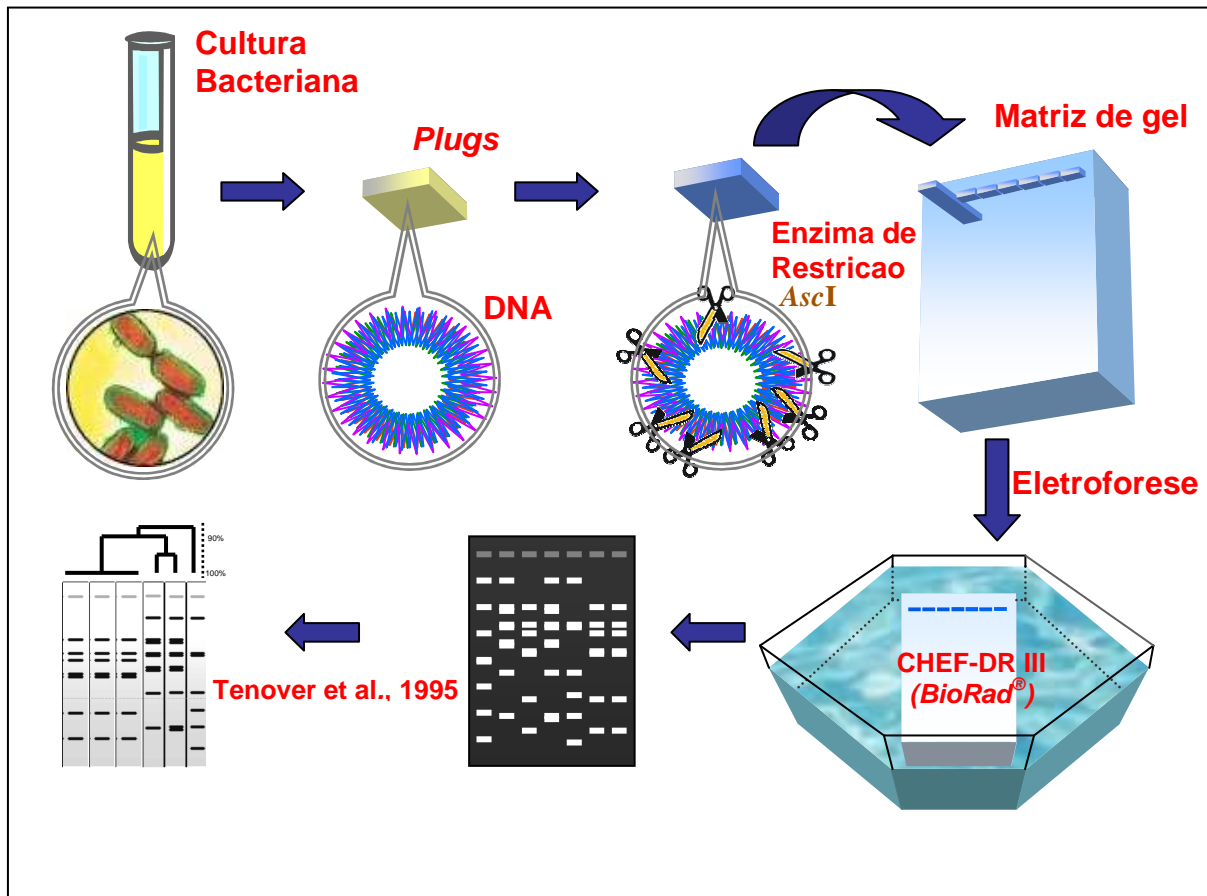


Figura 5. Esquema representativo da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A peste é considerada atualmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença reemergente e classificada como doença de notificação Classe I, de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) vigente, o que exige vigilância permanente dos focos. Ainda constitui um problema de Saúde Pública, porque persiste em vários focos naturais, em 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 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

Cepas de *Y. pestis* com novas características (multiresistentes) e novos ribotipos foram identificadas em alguns países (GALIMAND et al., 1997) o que poderá também ocorrer nos focos brasileiros. Diante da plasticidade do seu genoma, a identificação de novos marcadores, capazes de evidenciar diferenças entre cepas provenientes dos diversos focos, disseminados em numerosos países, tem interesse epidemiológico, porque tornaria possível detectar a introdução de uma cepa nova em um foco ou um país a partir de outros focos ou ainda na eventualidade de atividade de bioterrorismo.

O surgimento de cepas de *Y. pestis* multirresistentes a drogas e a recente preocupação com ações de bioterrorismo (INGLESBY et al., 2000) renovam o interesse em técnicas de tipagem dos isolados de *Y. pestis* para rastreamento de cepas e para determinar a origem dos isolados.

Os métodos fenotípicos de tipagem da *Y. pestis* mostram uma espécie muito homogênea, com apenas um sorotipo, um fagotipo e três biotipos. Estes biotipos não se distinguem quanto ao poder patogênico ou a forma clínica da doença, mas apresenta uma distribuição geográfica característica, sendo por isto considerado variedades regionais e associados a cada uma das pandemias do passado.

No entanto, essas informações fenotípicas são insuficientes para rastrear a origem de uma cepa ou o surgimento de novos clones. Diante disto, vários métodos moleculares foram avaliados para tipagem intraespecífica da *Y. pestis*.

O Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ desenvolveu diferentes estudos utilizando cepas brasileiras de *Y. pestis*, através de distintas

técnicas moleculares: perfil protéico, perfil plasmidial, PCR-ribotipagem, RAPD, RFLP-IS100. Os métodos utilizados apresentaram um baixo poder discriminatório, revelando na maioria das vezes um padrão genômico idêntico entre cepas oriundas de diferentes fontes e local de isolamento, demonstrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos. Diante disso, o Serviço de Referência em Peste ainda não possui um sistema de tipagem adequado ao estudo das cepas brasileiras de *Y. pestis*. O desenvolvimento de um sistema de tipagem adequado permitirá planejar e implementar medidas de controle.

O PFGE permite agrupar os isolados, evidenciando as variações genômicas, importantes nas investigações epidemiológicas. Essa técnica é considerada o padrão ouro dos métodos de tipagem molecular, sendo altamente discriminatória e válida para muitos patógenos bacterianos, inclusive *Y. pestis* de outros focos do mundo. Embora seja um método bastante utilizado para tipagem epidemiológica de muitas bactérias, estudos relacionados com a *Y. pestis* ainda são limitados.

De acordo com a variabilidade dos padrões de restrição e o alto poder discriminatório, a técnica PFGE pode ser utilizada para diferenciação e análise de novos isolados.

PERGUNTA CONDUTORA

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a eficácia da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado para tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* isoladas no Nordeste brasileiro?

HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado é uma técnica eficaz para tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* isoladas no Nordeste brasileiro.

OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Realizar tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* através da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

5.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o PFGE para tipagem molecular de cepas de *Y. pestis* isoladas no Nordeste do Brasil;
- Avaliar se o PFGE é eficaz na discriminação das cepas brasileiras de *Y. pestis*;
- Correlacionar os padrões PFGE obtidos entre as cepas de *Y. pestis* com os dados epidemiológicos conhecidos (fonte de isolamento, período e hospedeiro).

MATERIAIS E MÉTODOS



6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cepas de *Y. pestis* e condições de crescimento

Foram estudadas 43 cepas de *Y. pestis*, sendo 36 para a padronização da técnica do PFGE (Tabela 2). A avaliação do PFGE envolveu 22 cepas de *Y. pestis* obtidas antes e durante o surto de peste no Estado da Paraíba (ALMEIDA et al., 1985; 1989). As cepas foram isoladas de diferentes hospedeiros (homem, roedores e pulga) e períodos, tabela 2. Estas cepas estavam mantidas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste (SRP) do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM-Fiocruz.

As cepas foram reativadas para os trabalhos em caldo BHI – Brain Heart Infusion Broth (Difco) (Figura 6A), acondicionadas a 28°C por 24h e em seguida plaqueadas em meio BAB – Blood Agar Base (Difco).

6.2 Teste com o bacteriófago

A prova de identificação das cepas de *Y. pestis* foi realizada utilizando o bacteriófago específico antipestoso. Todas as cepas positivas para *Y. pestis* são lisadas pela ação do bacteriófago (Figura 6B). Após 48 a 72 horas de cultivo em placa, duas ou três colônias com morfologia característica de *Y. pestis* foram repicadas individualmente em caldo BHI e incubadas a 28°C por 24 horas. Uma alíquota de cada crescimento em BHI foi plaqueada em BAB e em local demarcado da placa foi adicionado o bacteriófago, seguido de incubação a 28°C. A sensibilidade ao fago é caracterizada por um halo de lise visualizado após 18-24h no local onde o fago foi adicionado (Figura 6B).

Tabela 2. Características das cepas de *Y. pestis* estudadas.

CEPAS	ORIGEM			
	FONTE	MUNICÍPIO	SITIO	ANO
P.PB 817*	OS	Natuba-PB	Estivas	1979
P.PB 820*	BL	Natuba-PB	Tauá	1979
P.PB 843*	BL	Natuba-PB	Salgadinho	1980
P.PB 851*	BL	Natuba-PB	Gitó	1980
P.PB 860*	BL	Salgado de São Félix -PB	Engenho Covão	1982
P.PB 862	H	Solânea-PB	Pedra D'Água	1986
P.PB 864	RR	Solânea-PB	Pedra D'Água	1986
P.PB 866	RR	Solânea-PB	Valério	1986
P.PB 867*	BL	Solânea-PB	Lagoa do Serrote	1986
P.PB 868*	BL	Solânea-PB	Cinco estrelas	1986
P.PB 869*	HS	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 870	BL	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 871*	BL	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 872	BL	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 873*	OS	Solânea-PB	Sete Lagoas	1986
P.PB 874	RR	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 876*	RR	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 877*	RR	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 878*	OS	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 879*	OS	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 880*	OS	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 881*	H	Remígio-PB	Serrinha	1986
P.CE 21 *	H	Ipu-CE	Baixinha	1982
P.CE 882*	H	Ipu-CE	Ipuzinho	1997
P.EXU 554*	H	São Benedito-CE	Pimenteira	1971
P.EXU 15*	H	Exu-PE	Retiro	1966
P.EXU 16*	H	São José do Belmonte-PE	Minador	1966
P.EXU 248*	H	São José do Belmonte-PE	Baixa Verde	1968
P.EXU 249*	H	São José do Belmonte-PE	Bananeira	1968
P.EXU 292*	H	São José do Belmonte-PE	Mata Redonda	1968
P.EXU 312*	H	Exu-PE	Badreci	1969
P.EXU 334*	H	Exu-PE	Gambá	1969
P.EXU 340/I	H	Ipubi-PE	Serra Antônio Barbosa	1969
P.EXU 351*	H	Triunfo-PE	Batinga	1969
P.EXU 674*	H	Exu-PE	Brejo de Santo Inácio	1974
P.EXU 738*	H	Araripina-PE	Cansanção	1975
P.EXU 769*	H	Ipubi-PE	Cacimbinha	1975
P.EXU 771*	H	Araripina-PE	Serra Antônio Domingo	1975
P.EXU 781*	H	Granito-PE	Catumbi	1975
P.EXU 788*	PJ	Araripina-PE	Alto Alegre	1977
P.EXU 825*	PJ	Tacaimbó-PE	Paulista	1979
P.EXU 827*	PJ	São Caetano-PE	Campo Alegre	1979
P.EXU 841*	H	Manaíra-PB	Fazenda	1979

OS: *Oryzomys subflavus*; BL: *Bolomys lasiurus*; RR: *Rattus rattus*; H: humano; HS: *Holochilus sciureus*; PJ:

Polygenis jordani *Cepas utilizadas para padronização

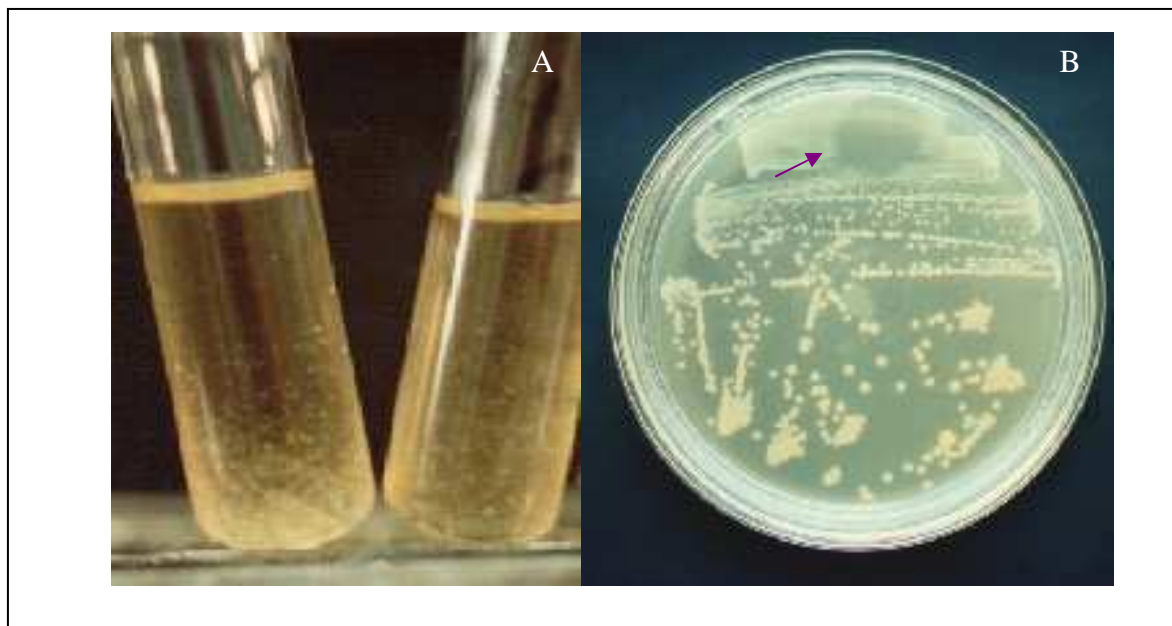


Figura 6. Características de crescimento e lise da *Y. pestis*. **A** – Crescimento da bactéria *Y. pestis* em meio BHI (Brain Heart Infusion); **B** – Ação do bacteriófago ocasionando lise nas células das bactérias da *Y. pestis* (seta), em meio BAB (Blood Agar Base).
Fonte: Almeida et al.(2003)

6.3 Padronização da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado – Sistema PFGE para tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis*

A técnica do PFGE foi padronizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo CDC/Fort Collins – Colorado – USA, utilizado para tipagem molecular de bactérias Gram-negativas (rede pulsenet). No entanto algumas modificações foram realizadas nas diferentes etapas do procedimento.

6.3.1 Preparação dos blocos de agarose (*plugs*) a partir de cultivo em Agar

Foram retiradas colônias isoladas crescidas em placas de BAB por 48h e preparado a suspensão bacteriana, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm e absorvância entre 0.9-2.0.

Os blocos de agarose (*plugs*), contendo a cultura, foram preparados em concentrações de 1% a 2% de agarose *Low Melting* (1%, 1,5% e 2%), em seguida

foi testada a preparação com a agarose *Seakem Gold* (1%) e por fim a agarose da Bio-Rad (1%, 1,5% e 2%). Para cada cepa, três a quatro *plugs* eram preparados.

6.3.2 Lise celular nos *plugs* de agarose

A etapa de lise celular nos *plugs* de agarose foi realizada com proteinase K (20mg/mL), variando o tempo de incubação entre 2 a 18 horas.

6.3.3 Lavagem dos *plugs* após lise celular

As lavagens dos *plugs* após lise celular foram feitas de acordo com protocolo desenvolvido pelo CDC, sem modificações. Os *plugs*, quando não clivados no mesmo dia, eram estocados a 4°C em TE (10mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8,0).

6.3.4 Digestão do DNA nos *plugs* de agarose com endonucleases de restrição

Durante a padronização da técnica do PFGE para tipagem das cepas de *Y. pestis*, foram analisadas as enzimas de restrição; *NotI*, *XbaI* e *AsclI*, usadas para gerar padrões genômicos de restrição. Para a análise com a enzima *NotI* foi testada a concentração de 10U, com incubação variando de 6, 18 e 21 horas a 37°C em banho-maria. Para a enzima *XbaI*, foram testadas as concentrações de 10U, 20U e 40U, com tempo de incubação entre 4, 18 e 21 horas a 37°C. A enzima *AsclI* foi avaliada com concentrações de 10U e 20U por 18 horas a 37°C.

6.3.5 Lavagens dos *plugs* de agarose após a digestão com as endonucleases de restrição

As lavagens dos *plugs* de agarose, para retirada do excesso das enzimas de restrição, foram realizadas com tampão TBE 0,5x por quatro vezes durante duas horas a temperatura ambiente. E também foi testada uma lavagem de 10 minutos, apenas uma vez, a temperatura ambiente com tampão TBE 0,5x preparado com água miliQ autoclavada.

6.3.6 Montagem do gel de agarose

A etapa de montagem do gel de agarose para corrida eletroforética foi realizada inicialmente com agarose *Low Melting* (Invitrogen) a 1% em TBE 0,5x. Em seguida, avaliou-se a agarose *Pulsed Field Certified* da Bio-Rad a 1%, e por fim foi testada a agarose *Seakem Gold* a 1%.

6.3.7 Condições de eletroforese usando o sistema CHEF DR III (Bio-Rad)

Para a padronização das condições eletroforéticas foi utilizado o sistema CHEF DR III (*Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields*/Bio-Rad). O pulso inicial para separação das bandas menores variou de 1.8s-2.2s e o pulso final para separação das bandas maiores variou entre 18.7s-35.1s. A miliamperagem utilizada para as corridas ficou compreendida de 4.5V/cm-6.0V/cm, correspondendo, aproximadamente a 140-300V. O tempo de corrida variou de 18 horas a 21 horas.

6.3.8 Coloração e documentação do gel de agarose

Após a corrida, o processo de visualização e digitalização das bandas foi feito de acordo com o protocolo desenvolvido pelo CDC, sem modificações. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1mg/mL) e as imagens foram capturadas sob iluminação UV usando o 1D Image Analysis *software*, versão 3.5 (Kodak Digital Science). O DNA do *S. aureus* ATCC 25923 digerido com *Sma*I foi utilizado como padrão interno para estudos comparativos e o Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) foi empregado como marcador de peso molecular.

6.3.9 Análise dos dados do PFGE

As cepas de *Y. pestis* foram distribuídas em grupos de cepas idênticas ou relacionadas de acordo com o padrão de bandas produzidos. O esquema utilizado por Tenover et al. (1995) foi empregado para diferenciar as cepas como indistinguíveis (nenhuma banda de diferença), intimamente relacionadas (1-3 bandas diferentes), possivelmente relacionadas (4-6 bandas de diferença) e não relacionadas ou diferentes (mais que seis bandas de diferença) (Tabela 3). Os resultados obtidos também foram analisados em forma de dendrograma gerado através do programa *Bionumerics*, desenvolvido pela Applied-Maths. O grau de homologia entre as amostras tipadas pela técnica de PFGE, foi determinado pelo coeficiente de Dice (DICE, 1945) e a correlação para agrupamento foi calculada por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com otimização de 0.40% e tolerância de 1.5%.

6.3.10 Determinação do Índice Numérico de Discriminação (D)

O poder discriminatório do método de tipagem 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.

Tabela 3. Classificação dos padrões PFGE desenvolvido por Tenover et al. (1995).

Categoria	Número de bandas diferentes	Número de eventos genéticos	Interpretação epidemiológica
Indistinguível	0	0	Isolados pertencentes ao mesmo surto
Intimamente relacionadas	1-3	1	Isolados, provavelmente, pertencentes ao mesmo surto
Possivelmente relacionadas	4-6	2	Isolados, possivelmente, pertencentes ao mesmo surto
Diferentes	≥ 7	≥ 3	Isolados não pertencentes ao mesmo surto

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Padronização do sistema PFGE

A primeira parte deste estudo foi padronizar o sistema PFGE para tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis*. O protocolo padronizado para estudos com as cepas de *Y. pestis* estão descritos abaixo:

7.1.1 Suspensão, Lise Celular e Lavagem dos *plugs*

As células bacterianas foram ressuspensas em tampão de suspensão celular (CSB) (100mM Tris: 100mM EDTA, pH 8,0) e ajustada à absorbância em 1,0 utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. Foi acrescido em 400ul da suspensão bacteriana, 400ul de agarose Bio-Rad 2% (1,0g de agarose, 47ml de TE e 5ml de SDS) para obtenção dos blocos de agarose (*plugs*) e 20ul de Proteinase K. Posteriormente, os *plugs*, contendo as células bacterianas, foram lisadas utilizando a solução de lise (50mM EDTA, pH 8,0 e 1% Sarcosyl + Proteinase K) e incubados a 54°C por 2 horas com constante e vigorosa agitação, para liberação do material genômico. Após o período de incubação, os *plugs* foram lavados, com água miliQ e TE (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 8,0) autoclavados e pré-aquecidos. Esta etapa é importante para retirar o excesso da proteinase K. Quando os *plugs* não foram submetidos à digestão imediata foram estocados a 4°C em TE.

7.1.2 Digestão do DNA nos *plugs* de agarose com endonucleases de restrição

Para cada digestão, foram utilizados 1/3 de cada *plug* formado após corte com bisturi. Um ou mais *plugs* foram submersos em 100uL do tampão de restrição IV 1x (New England Biolabs) por 10 min a 37°C. Posteriormente, o tampão de

restrição foi substituído por 100uL de tampão de restrição IV 1x contendo 20U da endonuclease *Ascl* (New England Biolabs) e incubado por 18h a 37°C. Inicialmente foram usados para gerar padrões de restrição genômico nas cepas de *Y. pestis* três enzimas de restrição; *NotI*, *XbaI* e *Ascl*. No entanto a enzima *Ascl* gerou um padrão de bandas de mais fácil análise pelo protocolo PFGE obtido para *Y. pestis* (Figura 7). A reação foi interrompida pela substituição do tampão de restrição por 200 uL de tampão TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) por 10 min à temperatura ambiente.

7.1.3 Eletroforese usando o sistema CHEF DR III (Bio-Rad)

A corrida foi realizada em gel de agarose 1% *Seakem Gold* em tampão TBE 0,5X e realizada no sistema CHEF III (*Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields/Bio-Rad*) sob voltagem de 4,5V/cm a 14°C por 21 horas. A agarose *Seakem Gold* demonstrou melhor resolução dos padrões de restrição que as demais agaroses testadas. Esta agarose é utilizada em inúmeros trabalhos relacionados com o PFGE. Os pulsos da corrida eletroforética que melhor separaram as bandas digeridas com a *Ascl* foi 1.8s para separação dos fragmentos pequenos e 18,7s para separação dos fragmentos maiores.

O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular DNA Ladder PFG (Figura 7). Os fragmentos foram fotografados após coloração do gel com solução de brometo de etídio (1mg/ml), visualizados em transiluminador de UV e digitalizados pelo 1D Image Analysis software, versão 3.5 (Kodak Digital Science) em câmara Kodak.

7.2 Avaliação do sistema PFGE na tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis*

O padrão da macrorestrição genômica obtido pela *Ascl*, gerou bandas que abrangeram de 17–24 fragmentos, sendo considerado apenas os fragmentos entre

~48.5 e ~300kb para comparação entre os perfis obtidos (Figura 8). Observando uma similaridade de ~70% foram identificados dois ramos distintos. Ao considerar uma similaridade de 80%, oito grupos foram obtidos, denominados de A-H. O primeiro ramo abrangeu sete amostras de *Y. pestis* distribuídas em dois grupos denominados de A e B, com apenas uma amostra isolada de humano. Neste ramo apenas uma cepa não foi isolada durante o surto de 1986. O segundo ramo abrangeu 15 amostras, onde quatro foram isolados antes do surto de 1986, entre elas 14 foram isoladas de roedores e apenas uma foi isolada de humano (Figura 8). Neste ramo, 13 perfis foram distribuídos em seis grupos (C-H) por diferirem em pelo menos uma banda. Este grupo compreendeu o maior número de isolados. Apenas um grupo (H), incluiu apenas uma amostra.

A técnica do PFGE distribuiu as 22 cepas de *Y. pestis* isoladas antes e durante o surto de 1986, de cinco hospedeiros e treze sítios dentro do foco da Borborema em oito grupos e 19 subgrupos (Tabela 4). Resultando em um índice discriminatório de 0.93.

A similaridade de 95% subdividiu os grupos em 19 genótipos, diferenciando-se em pelo menos em uma banda. Estes genótipos foram classificados em subgrupos de acordo com o grupo pertencente: A1-A4 (grupo A); B1-B2 (grupo B); C1-C3 (grupo C); D1-D2 (grupo D); E1-E2 (grupo E); F1-F2 (grupo F); G1-G3 (grupo G) e H (grupo H) (Figura 8, Tabela 4).

As amostras de *Y. pestis* isoladas de *Oryzomys subflavus* foram incluídas em dois grupos (A e D), subtipados em quatro subgrupos (A1, A3, D1, D2). Os isolados de *Rattus rattus* foram distribuídos em cinco grupos e subgrupos (A2, B1, C2, F1, G2) e os isolados de *Bolomys lasiurus* foram incluídos em 6 grupos (B, C, E, F, G, H) e subtipados em oito subgrupos (B2, C1, C3, E1, F1, G1, G3, H). O isolado de *Holochilus sciureus* foi incluído num único subgrupo F2. Os isolados de humanos foram incluídos em dois grupos distintos (A4 e E2) (Figura 8, Tabela 4).

O grupo A contém cinco isolados (P.PB 817, P.PB 862, P.PB 877, P.PB 878 e P.PB 880), onde três foram obtidos durante o surto ocorrido em 1986 e apenas um foi isolado antes do surto, em 1979. Além disso, essas amostras foram obtidos em diferentes sítios (Bacalhau, Cinco Lagoas, Estivas e Pedra d'Água) pertencentes aos municípios de Solânea e Natuba. Os padrões obtidos entre essas amostras foram diferenciados por apenas uma banda (Figura 8, Tabela 4).

O grupo B incluiu duas cepas (P.PB 864 e P.PB 867) isoladas durante o surto de 1986, a partir de dois hospedeiros (*R. rattus* e *B. lasiurus*) dos sítios Pedra d'água e Lagoa do Serrote do município de Solânea. Os padrões obtidos entre essas amostras foram diferenciados por apenas duas bandas (Figura 8, Tabela 4).

O grupo C abrangeu três amostras (P.PB 868, P.PB 870 e P.PB 874) isoladas de dois hospedeiros (*R. rattus* e *B. lasiurus*) e nos sítios (Pedra d'água, Bacalhau e Cinco Estrelas) do município de Solânea. Essas cepas se diferenciaram por uma banda ausente apenas na cepa P.PB 868 (Figura 8, Tabela 4).

O grupo D compreendeu duas cepas (P.PB 873 e P.PB 879) obtidas de um mesmo período (1986) e da mesma espécie de roedor (*O. subflavus*), porém em diferentes sítios (Sete Lagoas e Pedra d'água) do mesmo município (Solânea). Estas amostras apresentaram três bandas diferenciadas (Figura 8, Tabela 4).

O grupo E compreendeu duas cepas (P.PB 820 e P.PB 881) isoladas a partir de dois hospedeiros, um roedor (*B. lasiurus*) e humano, respectivamente. As amostras foram obtidas de diferentes sítios (Tauá e Serrinha) e diferentes municípios (Natuba e Remígio). Estas cepas apresentaram três bandas diferentes entre si (Figura 8, Tabela 4).

O grupo F incluiu três cepas (P.PB 843, P.PB 869 e P.PB 876) isoladas de *B. lasiurus*, *R. rattus* e *H. sciureus*. Estas amostras foram obtidas em períodos diferentes, P.PB 843 em 1980 e P.PB 869 e P.PB 870 em 1986, dos sítios (Salgadinho, Cinco Lagoas e Pedra d'água) e municípios (Natuba e Solânea). Essas cepas se diferenciaram pela presença de uma banda apenas na cepa P.PB 843 (Figura 8, Tabela 4).

O grupo G compreendeu quatro cepas (P.PB 851, P.PB 860, P.PB 866 e P.PB 872), duas destas cepas (P.PB 851 e P.PB 860) foram isoladas antes do surto (1980 e 1982, respectivamente) e as outras cepas durante o surto. A bactéria foi isolada de dois hospedeiros, três cepas a partir do *B. lasiurus* e uma do *R. rattus*, e de diferentes sítios (Gitó, Engenho do Covão, Valério e Cinco Lagoas) e municípios (Natuba, Salgado de São Félix e Solânea). Estas cepas apresentaram três bandas diferentes entre si (Figura 8, Tabela 4).

O grupo H, quando analisado com 95% de similaridade, apenas incluiu uma amostra (P.PB 871) isolada durante o surto de peste (1986), de *B. lasiurus* e no sítio de Pedra d'água, no município de Solânea.

Entre as 22 cepas analisadas, seis amostras foram enquadradas em três perfis genotípicos (A1, F1 e G1) (Figura 8). No grupo A, as amostras P.PB 878 e P.PB 880 foram agrupadas no mesmo perfil A1, isoladas de um mesmo roedor, do mesmo sítio e durante o período do surto em 1986. No grupo F, as amostras P.PB 843 e P.PB 876 agruparam em único perfil F1, isoladas do roedor *B. lasiurus* e *R. rattus*, do sítio Salgadinho e Cinco Lagoas e de diferentes períodos, 1980 e 1986, respectivamente. No grupo G, as amostras P.PB 851 e P.PB 860 agruparam no mesmo perfil G1, isoladas do mesmo roedor *B. lasiurus*, em sítios Gitó e Engenho Covão, e em período anterior ao surto (1980 e 1982), respectivamente (Figura 8, Tabela 4).

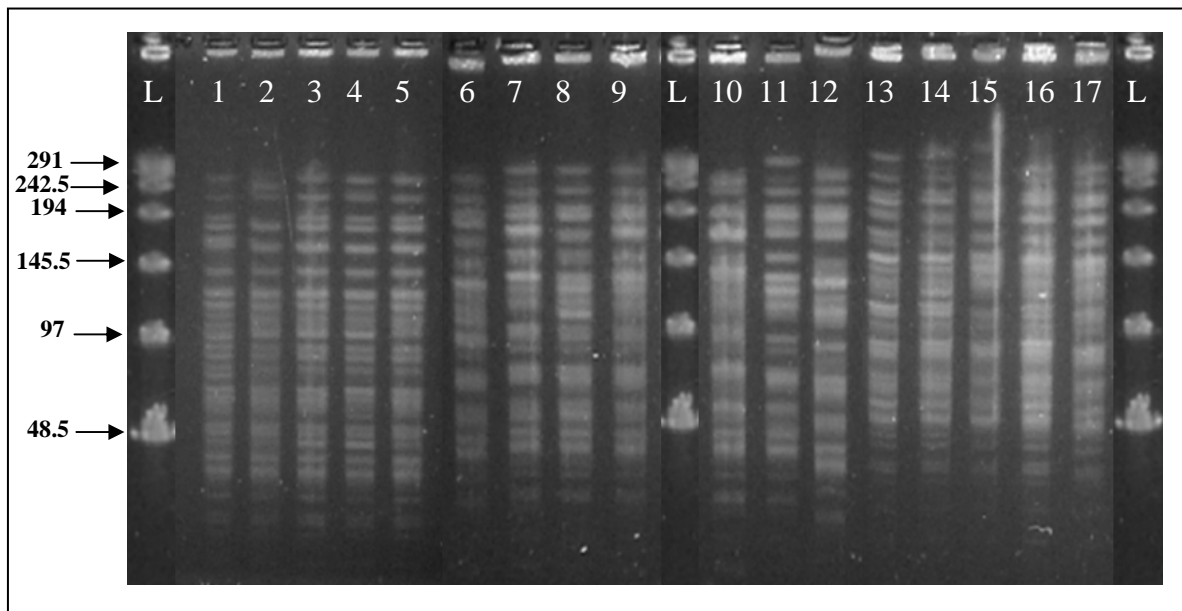


Figura 7. PFGE em gel a 1% de agarose *Seakem Gold* em tampão TBE 0,5X, clivado com a enzima *Ascl* e realizada no sistema CHEF III sob voltagem de 4,5V/cm a 14°C por 21 horas: L - DNA Ladder PFGE (Kb), 1 - P.PB 873, 2 - P.PB 877, 3 - P.PB 878, 4 - P.PB 879, 5 - P.PB 880, 6 - P.PB 843, 7 - P.PB 851, 8 - P.PB 860, 9 - P.PB 866, L - DNA Ladder PFGE, 10 - P.PB 867, 11 - P.PB 869, 12 - P.PB 876, 13 - P.PB 817, 14 - P.PB 820, 15 - P.PB 864, 16 - P.PB 871, 17 - P.PB 872, L -

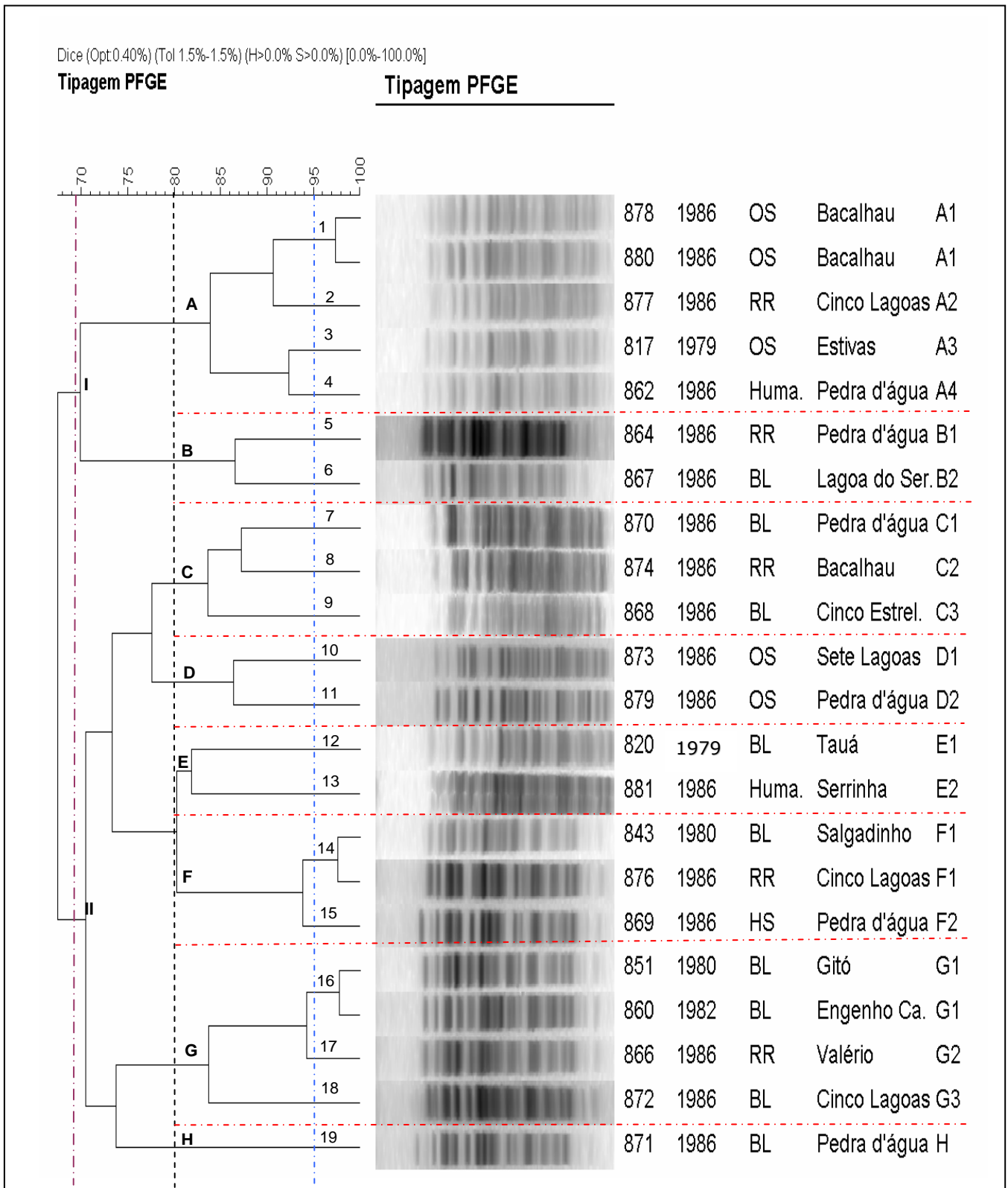


Figura 8. Dendrograma gerado pela análise do PFGE usando o Dice/UPGMA (Bionumerics / Applied Maths). O DNA cromossômico dos 22 isolados foram clivados com a endonuclease de restrição *Ascl*. Os padrões foram ordenados do mais similar (de cima para baixo) ao menos similar. Os perfis são marcados a esquerda com números e os *clusters*, a 80% de similaridade, são descritos com letras do alfabeto.

Tabela 4. Características das cepas de *Y. pestis* isoladas antes e durante um surto de peste no Estado da Paraíba analisadas pelo PFGE.

Cepas	Origem				Perfil Genotípico	
P.PB 866	RR	Borborema (PB)	Solânea	Valério	1986	G2
P.PB 869	HS	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'água	1986	F2
P.PB 870	BL	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'água	1986	C1
P.PB 872	BL	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'água	1986	G3
P.PB 871	BL	Borborema (PB)	Solânea	Cinco Lagoas	1986	H
P.PB 873	OS	Borborema (PB)	Solânea	Sete Lagoas	1986	D1
P.PB 876	RR	Borborema (PB)	Solânea	Cinco Lagoas	1986	F1
P.PB 877	RR	Borborema (PB)	Solânea	Cinco Lagoas	1986	A2
P.PB 879	OS	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'água	1986	D2
P.PB 881	H	Borborema (PB)	Remígio	Serrinha	1986	E2
P.PB 862	H	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'Água	1986	A4
P.PB 864	RR	Borborema (PB)	Solânea	Pedra D'água	1986	B1
P.PB 880	OS	Borborema (PB)	Solânea	Bacalhau	1986	A1
P.PB 874	RR	Borborema (PB)	Solânea	Bacalhau	1986	C2
P.PB 868	BL	Borborema (PB)	Solânea	Cinco estrelas	1986	C3
P.PB 817	OS	Borborema (PB)	Natuba	Estivas	1979	A3
P.PB 820	BL	Borborema (PB)	Natuba	Tauá	1979	E1
P.PB 860	BL	Borborema (PB)	Salgado de São Félix	Engenho Covão	1982	G1
P.PB 867	BL	Borborema (PB)	Solânea	Lagoa do Serrote	1986	B2
P.PB 843	BL	Borborema (PB)	Natuba	Salgadinho	1980	F1
P.PB 851	BL	Borborema (PB)	Natuba	Gitó	1980	G1
P.PB 878	OS	Borborema (PB)	Solânea	Bacalhau	1986	A1

OS: *Oryzomys subflavus*; BL: *Bolomys lasiurus*; RR: *Rattus rattus*; H: humano; HS: *Holochilus sciureus*.

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi padronizar e avaliar uma ferramenta molecular para ser aplicada em estudos epidemiológicos de cepas brasileiras de *Y. pestis*. Algumas bactérias patogênicas, como a *Y. pestis*, são geneticamente muito homogêneas, apresentando dificuldades para a discriminação das cepas (ACHTMAN et al., 1999). A caracterização dos isolados é de fundamental importância em estudos epidemiológicos, que auxilia no rastreamento e disseminação do patógeno (TENOVER et al., 1995).

Um sistema de tipagem específico e eficiente é de importância fundamental para uma investigação epidemiológica. Importantes decisões de saúde pública a respeito das instituições de medidas preventivas são baseadas, primeiramente, em dados de tipagem molecular (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995).

Vários métodos baseados na biologia molecular para tipagem de *Y. pestis* já foram previamente descritos; PCR-ribotipagem, RAPD, RFLP-IS100, *Southern blot* (GUIYOULE et al., 1997; HUANG et al., 2002; LEAL, 1998; LUCIER; BRUBAKER, 1992;). Até o momento, os resultados obtidos com técnicas para tipagem de cepas brasileiras de *Y. pestis* indicaram apenas isolados homogêneos, demonstrando a baixa aplicabilidade desses métodos para estudos epidemiológicos de cepas de *Y. pestis* isoladas em nossa região (LEAL, 1998; SOBREIRA, 2002).

Entre muitos métodos moleculares avaliados para tipagem molecular bacteriana, a análise da macrorestrição pelo PFGE tem mostrado ser, particularmente útil para o agrupamento e diferenciação de muitas bactérias patogênicas; *Escherichia coli* (BARRETT et al., 1994), *Campylobacter* (FITZGERALD et al., 2001), *Vibrio cholerae* (MAHALINGAM et al., 1994). Embora, a sensibilidade e o poder discriminatório do PFGE dependam do organismo a ser analisado e a enzima de restrição usada, a alta relevância epidemiológica tem feito desta técnica o “padrão ouro” para tipagem de muitas bactérias patogênicas; *Salmonella typhi* (NAIR et al., 1994), *Yersinia enterocolitica* (NAJDENSKI et al., 1994), *Staphylococcus aureus* (TENOVER et al., 1995), *E. coli* (DAVIS et al., 2003).

Os protocolos padrões de PFGE são realizados em torno de cinco a seis dias (GOERING; WINTERS, 1992; MATUSHEK et al., 1996). Esta é a primeira descrição

da aplicação do PFGE em cepas brasileiras de *Y. pestis* e que o resultado é obtido a partir de um protocolo realizado em 72 horas. Além disso, este método de tipagem conseguiu demonstrar padrões genômicos variáveis que contribuíram para análise e reconhecimento do genoma dessa espécie em estudos posteriores.

A primeira etapa deste estudo foi padronizar e desenvolver um protocolo de análise epidemiológica para cepas brasileiras de *Y. pestis*, antes consideradas como cepas homogêneas e indistinguíveis pela análise de outros métodos moleculares. Um protocolo padronizado de PFGE para tais estudos será útil na compreensão e controle da expansão da peste. O desenvolvimento e a padronização deste protocolo consistiram em uma completa otimização dos reagentes e das condições de reação, para assegurar que este método obtivesse resultados consistentes e reprodutíveis.

Durante a padronização foram analisadas 36 cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes, locais e datas de isolamento para adequar os padrões e reprodutibilidade da técnica. Em seguida, a análise do PFGE analisou 22 cepas de *Y. pestis*, isoladas antes e durante um surto ocorrido em 1986 no estado da Paraíba. O PFGE permitiu distribuir essas cepas de *Y. pestis*, de um grupo homogêneo obtido de quatro municípios do estado da Paraíba, em diferentes padrões de macrorestrição. Diante desses resultados foi possível diferenciar as cepas de *Y. pestis* isoladas antes e durante o surto de peste. Foi observado que o PFGE pode facilitar a tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis* e o estudo epidemiológico, porque permite analisar todo o genoma do organismo, não apenas regiões específicas do genoma bacteriano.

Entretanto, foi possível estabelecer uma relação genética e epidemiológica entre as amostras analisadas, apesar do PFGE ter gerado padrões diferentes entre as cepas de *Y. pestis*. O grau de identidade genética detectada entre os isolados, quando considerado 80% de similaridade, foi alto, já que pertenceram à mesma localização, mesmo biovar (*Orientalis*) e mesmo foco (Borborema). Além disso, algumas cepas isoladas no período anterior ao surto foram enquadradas no mesmo grupo genotípico de cepas isoladas durante o surto de 1986, onde é possível que estas amostras de 1986 sejam recorrentes dos isolados de 1979, 1980 e 1982. Esta relação sugere a permanência de clones circulando na região, em épocas anteriores ao surto, mesmo depois de alguns anos de quiescência da peste.

Embora o padrão PFGE das 22 cepas analisadas antes e durante o surto de 1986, tenha gerado 19 genótipos, estas amostras são consideradas relacionadas geneticamente, pois apresentaram no máximo três bandas que as diferenciam uma da outra. Segundo Tenover et al. (1995), isolados bacterianos diferenciados por um simples evento genético (mutação pontual, ou inserção, ou deleção de DNA), refletindo uma diferença de uma a três bandas, são intimamente relacionadas, conseqüentemente, isolados pertencentes ao mesmo surto.

Além disso, estudos anteriores com cepas de *Y. pestis* pelo PFGE, demonstraram que variações de duas a três bandas são observadas apenas em cepas da mesma espécie quando estas são cultivadas repetidamente ou repicadas múltiplas vezes, mas de uma mesma origem (HUANG et al., 2002). O índice discriminatório para o PFGE foi de 0,93. Segundo Hunter e Gaston (1988), um índice maior que 0.90 pode ser interpretado como confiante e por isso desejável.

Os resultados obtidos pelo PFGE também demonstraram que as cepas responsáveis pelo surto de 1986 pertenceram ao mesmo grupo genético das cepas isoladas em período anterior ao surto na Paraíba e que estes mesmos clones circulam no homem e em diferentes espécies de roedores (*O. subflavus*, *B. lasiurus*, *R. rattus*, *H. sciureus*). Uma possível explicação estaria relacionada ao ciclo epidemiológico da peste, que é uma zoonose de roedores, e que o homem se contamina ao se expor ao ecossistema da infecção (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Das 22 cepas analisadas, ~ 41% foram isoladas do *B. lasiurus*, roedor considerado o principal responsável pelo epizootização da peste nos focos do nordeste do Brasil (BALTAZAR, 2004). As cepas isoladas de humano foram agrupadas, juntamente, com cepas originárias de roedores, por provavelmente, estas cepas terem participado do ciclo da peste neste surto. Resultados anteriores (OLIVEIRA, 2006) reforçam os achados obtidos neste estudo, com as cepas de *Y. pestis* isoladas durante o surto de 1986, quando investigadas com outra ferramenta molecular, o MLVA, através da análise de seis *loci* VNTRs. O MLVA permitiu distribuir as 19 cepas do surto de 1986 em seis perfis genotípicos que foram encontrados nas cepas de alguma espécie de roedor, e as cepas de origem humana foram enquadradas em dois perfis. Estes dois perfis também foram encontrados no *B. lasiurus*.

O MLVA em *Y. pestis* (OLIVEIRA, 2006) e o PFGE deste estudo permitiram encontrar o mesmo perfil genotípico em cepas isoladas de diferentes sítios e

municípios e por outro lado, cepas originadas da mesma fonte como as dos *R. rattus* com grande variedade de perfis genotípicos. A identificação de diferentes genótipos em cepas isoladas de uma mesma área geográfica, ano e fonte de isolamento sugere que populações distintas de *Y. pestis* circulavam na área de foco durante o surto de 1986.

LEAL et al. (1999, 2000) e LEAL-BALBINO et al. (2004, 2006) observaram alterações no genoma (plasmidiais e cromossomais) em cepas brasileiras de *Y. pestis* quando estocadas e manipuladas no laboratório. Em vista disso, pode-se supor que as variações observadas nas cepas do surto da Paraíba poderiam ter sido resultado de alterações *in vitro*. No entanto, análises realizadas por Oliveira (2006) através do VNTR em cepas parentais e nas culturas derivadas das cepas P.CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 não detectou modificações nesses *loci*, demonstrando que não houve variações *in vitro*.

Embora o mecanismo de diversidade genética ainda permaneça obscuro, os resultados obtidos neste estudo, bem como outros (NAJDENSKI et al., 1994), indicam que o genoma da *Y. pestis* é geralmente instável ao nível de macrorestrição. Esta variabilidade pode ser útil para determinação precisa da origem de uma cepa (HUANG et al., 2002). O sequenciamento completo do genoma da cepa CO92 de *Y. pestis* sugere que esta variabilidade em padrões de restrição pode ser devido à presença de diferentes seqüências de inserções presentes em todo o genoma da *Y. pestis* (PARKHILL et al., 2001).

Os resultados também sugerem que os padrões obtidos de *Y. pestis* podem ser gerados independentemente de cada um (HUANG et al., 2002). Isto foi verificado pelo fato de várias cepas isoladas de um roedor mostrarem diferentes níveis de homologia. Cepas isoladas de *B. lasiurus* foram agrupadas em seis dos oito grupos identificados. Entretanto, apenas uma cepa (P.PB 871) não foi agrupada com as demais amostras.

O uso deste protocolo padronizado de PFGE para tipagem de cepas brasileiras de *Y. pestis* permite que o laboratório de peste possa tipar os isolados em poucos dias, permitindo auxiliar na identificação da fonte responsável pela infecção. Além de uma larga implicação em estudos epidemiológicos e intervenções terapêuticas em situações de surto.

Em conclusão, os resultados encontrados demonstraram que o PFGE é uma ferramenta eficiente na discriminação das cepas isoladas no Nordeste brasileiro. De

acordo com a variabilidade dos padrões de restrição e o alto poder discriminatório, a técnica PFGE pode ser utilizada para diferenciação e análise de novos isolados. Além disso, a combinação com outras técnicas de tipagem molecular que analisam regiões específicas do genoma bacteriano (VNTR) pode aumentar a capacidade discriminatória das técnicas de tipagem molecular.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

- O PFGE permitiu diferenciar e classificar as cepas de *Y. pestis* isoladas na Paraíba, mostrando-se uma ferramenta promissora para discriminação das cepas isoladas no Nordeste brasileiro;
- O protocolo padronizado do PFGE para tipagem de cepas brasileiras de *Y. pestis* facilitará futuros estudos epidemiológicos e a caracterização de novos isolados.
- Cepas de *Y. pestis* com diferentes genótipos foram responsáveis pelo surto ocorrido em 1986 no Estado da Paraíba.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

ACHTMAN, M. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 17837-17842, 2004.

ALMEIDA, A. M. P. et al. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos de peste no Nordeste do Brasil de 1966 a 1982. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 27, p. 207-218, 1985.

ALMEIDA, A. M. P. et al. Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 249-256, 1989.

ALMEIDA, A. M. P. et al. **Manual de Peste**. Recife: Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2003. 33 p.

ALMEIDA, A. M. P.; TAVARES, C.; LEAL-BALBINO, T. C. Peste. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias v. 2**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 126, p. 1509-1522.

ARAGÃO, A. I. et al. Vigilância da peste no estado do Ceará: 1990-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, p. 143-148, 2002.

BALTAZARD M. Recherches sur la peste au Brésil. 4e rapport. Progress report. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Masson, v. 97, supl., p. 93-117, 2004.

BARRETT, T. J. et al. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 3013-3017, 1994.

BEN-GURION, R.; HERTMAN, I. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 19, p. 289-297, 1958.

BRUBAKER, R. R. The Vwa+ virulence factor of *Yersinia*: the molecular basis of the attendant nutritional requirement for Ca⁺⁺. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 5, p. 748-758, 1983.

BUCHRIESER, C.; PRENTICE, M.; CARNIEL, E. The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 9, p. 2321-2329, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 44, p. 157-160, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report: Human Plague**, Atlanta, v. 55, p. 940-943, 2006.

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**, Washington, v. 188, p. 4453-4463, 2006.

CHU, M.C. **Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests**. Atlanta: CDC; Geneva: WHO, 2000. 129p.

DAVIS, M. A. et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 1843-1849, 2003.

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

DEN DUNNEN, J. T.; VAN OMMEN, G. J. B. Methods for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **The Annals of Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 38, p. 161-177, 1992.

DENNIS, D. T. et al. **Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control**. Geneva: World Health Organization, 1999. 172 p.

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

DEVIGNAT R. Geographical distribution of three species of *Pasteurella pestis*. **Schweizerische Zeitschrift für Pathologie und Bakteriologie**, [s.l.], v. 16, p. 509-514, 1953.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology Letters**, Oxford, v. 26, p. 379-393, 1945.

DONG, X. Q.; LINDLER, L. E.; CHU, M. C. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*. **Plasmid**, New York, v. 43, p. 144-148, 2000.

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

DROZDOV, I. G. et al. Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 42, p. 264-268, 1995.

DU, Y.; ROSQVIST, R.; FORSBERG, A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1453-1460, 2002.

FETHERSTON, J. D.; SCHUETZE, P.; PERRY, R. D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 18, p. 2693-26704, 1992.

FILIPPOV, A. A. et al. The role of IS-elements of *Yersinia pestis* (Lehmann, Neumann) in the emergence of calcium-independent mutations. **Genetika**, Moskva, v. 26, p. 1740-1748, 1990.

FITZGERALD, C. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2386-2390, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Peste in: *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**, Palo Alto, v. 50, p. 505-528, 2005.

GALIMAND, M. et al. P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 337, p. 677-680, 1997.

GOERING, R. V.; WINTERS, M. A. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 577-580, 1992.

GUIYOULE, A. et al. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 2826-2833, 1997.

GUIYOULE, A. et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in clinical isolate of *Yersinia pestis*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, p. 43-48, 2001.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

HINNEBUSCH, B. J.; PERRY, R. D.; SCHWAN, T. G. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. **Science**, Washington, v. 273, p. 367-70, 1996.

HINNEBUSCH, B. J. et al. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, Washington, v. 296, p. 733-735, 2002.

HINNEBUSCH, B. J. Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flea vector of plague. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 529, p. 55-62, 2003.

HU, P.; BRUBACKER, R. R. Characterization of pesticin. Separation of antibacterial activities. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 249, p. 4749-4753, 1974.

HUANG, X. Z. et al. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1164-1173, 2002.

HUANG, X. Z.; NIKOLICH, M. P.; LINDLER, L. E. Current trends in plague research: from genomics to virulence. **Clinical Medicine & Research**, London, v. 4, p. 189-199, 2006.

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**, Washington, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

INGLESBY, T. V. et al. Plague as a biological weapon. **Jama**, Chicago, v. 283, p. 2281-2290, 2000.

KOSTMAN, J. R. et al. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas Cepacia* determined by Polymerase Chain Reaction Ribotyping. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2084-2087, 1992.

LEAL, N. C. et al. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, p. 371-373, 1996.

LEAL, T. C.; LEAL, N. C.; DE ALMEIDA, A. M. The absence of *Yersinia enterocolitica* in foods and animal reservoirs in areas of the state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 30, p. 193-6, 1997.

LEAL, N. C. **Potencial do uso de PCR e Hibridização com Sondas Moleculares no estudo da *Yersinia pestis***. 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de 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**, São Paulo, v.4 1, p. 339-342, 1999.

LEAL, N. C. et al. Homology among extra-cryptic DNA bands and typical plasmids in brasilian *Yersinia pestis*. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 20-24, 2000.

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**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 727-32, 2004.

LEAL-BALBINO, T. C. et al. The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 126-131.2006.

LÊ FLECHE, P. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, London, v. 1, n 2, 2001.

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

LOIEZ, C. et al. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 4873-5, 2003.

LUCIER, T. S.; BRUBAKER, R. R. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed field electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 2078-2086, 1992.

MAHALINGAM, S. et al. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 2975-2979, 1994.

MATUSHEK, M. G.; BONTEN, M. J. M.; HAYDEN, M. K. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2598–2600, 1996.

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

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**, Washington, v. 184, p. 1019-1027, 2002.

NAIR, S. et al. Genome fingerprinting of *Salmonella typhi* by pulsed-field gel electrophoresis for subtyping common phage types. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 391-402, 1994.

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

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, M. B. M. **Diversidade genética em cepas de *Yersinia pestis***. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Plague in the Americas**. Washington, 1965. 156 p.

PARKHILL, J. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. **Nature**, London, v. 413, p. 523-527, 2001.

PEREIRA, M. S. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 34, p. 1-5, 2002.

PERRY, R.; FETHERSTON, J. D. *Yersinia pestis*: etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 35-66, 1997.

POLLITZER, R. History and present distribution of plague in: plague. **World Health Organization Monograph Series**, Geneva, v. 22, p. 11-45, 1954.

POURCEL, C. et al. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **BMC Microbiology**, London, v. 4, p. 22, 2004.

PROTSENKO, O. A.; FILIPPOV, A. A.; KUTYREV, V. V. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 11, p. 123-128, 1991.

SMITH, C. L.; CONDEMINE, G. New approaches for physical mapping of small genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 1167-1172, 1990.

SOBREIRA, M. **Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rna 16s-23s em diferentes gêneros bacterianos**. 2002. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

SODEINDE, O. A.; GOUGUEN, J. D. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection Immunity**, Washington, 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**, Washington, v. 56, p. 2749-52, 1988.

SONG, Y. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA research**, Tokyo, v. 11, p. 179-197, 2004.

SOUZA, G. T. **Avaliação da técnica Nested-PCRTbU para aplicação no diagnóstico da Peste**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

STAGGS, T. M.; PERRY, R. D. *Fur* regulation in *Yersinia* species. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 2507-2516, 1992.

STRALEY, S. C. et al. Regulation by Ca^{2+} in the *Yersinia* low Ca^{2+} response. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1005-1010, 1993.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 9, p. 2233-2239, 1995.

VAN BELKUM, A. et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 547-560, 2001.

VIEIRA, J. B.; COELHO, G. E. Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 31, p. 113-119, 1998.

ZHOU, D. et al. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 186, p. 5147-5152, 2004.

WELKOS, S. L. et al. Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of *Yersinia pestis*. **Contributions To Microbiology And Immunology**, Basel, v. 13, p. 299-305, 1995.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-8, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-5, 1990.

APÊNDICE

Apêndice A - Artigo**Padronização da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para genotipagem de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no estado da Paraíba, Brasil.**

MPS Barros¹, VM Silveira-Filho¹; RH Benevides¹; K Kubota²; AMP Almeida¹; TC Leal-Balbino¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz, Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil

²Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Diseases Control and Prevention, Ft. Collins, Colorado.

E-mail do autor de correspondência: mariapaloma@oi.com.br

Keywords: plague – *Yersinia pestis* – genotyping – PFGE

**Manuscrito a ser submetido para publicação na revista
Letters in Applied Microbiology**

Padronização da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para genotipagem de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no estado da Paraíba, Brasil.

MPS Barros¹, VM Silveira-Filho¹; RH Benevides¹; K Kubota²; AMP Almeida¹ and TC Leal-Balbino¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

²Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Diseases Control and Prevention, Ft. Collins, Colorado.

Resumo

Objetivos: Padronizar e avaliar a eficácia da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) na discriminação de cepas brasileiras de *Yersinia pestis*, correlacionando os padrões obtidos com os dados epidemiológicos.

Métodos e Resultados: Foram estudadas 43 cepas de *Y. pestis*, sendo 36 para padronização da técnica do PFGE e 22 cepas isoladas antes e durante um surto de peste ocorrido no Estado da Paraíba em 1986 para avaliação da técnica na tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis*. A padronização do PFGE para estudos com as cepas brasileiras foi baseada em protocolo desenvolvido pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*). De acordo com padrões obtidos com a endonuclease de restrição *Ascl*, 19 perfis genotípicos foram gerados. Esses genótipos foram enquadrados em dois ramos e oito grupos (A-H) geneticamente relacionados.

Conclusões: A técnica do PFGE mostrou-se capaz de diferenciar as cepas de *Y. pestis* de um grupo homogêneo obtidos antes e durante o surto de peste em 1986, ocorrido na Paraíba. Foi observado diante dos resultados, que o PFGE facilitará a tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis* e ajudará em estudos epidemiológicos e intervenções terapêuticas em situações de surto.

Significância e Impacto do Estudo: Um protocolo padronizado e mais rápido do PFGE para genotipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis* será útil na compreensão e controle da expansão da peste. Os resultados encontrados demonstraram que o PFGE é uma ferramenta eficiente na discriminação das cepas isoladas do Nordeste brasileiro. De acordo com a variabilidade dos padrões de restrição e o alto poder

discriminatório, a técnica PFGE pode ser utilizada para diferenciação e análise de novos isolados.

Introdução

A peste é uma zoonose primordialmente de roedores silvestres, causada pela bactéria *Yersinia pestis* e transmitida de um animal a outro através da picada de pulgas infectadas. O homem se contamina ao entrar em contato com roedores ou outros animais infectados (raposas, cães e gatos) e suas pulgas (Almeida *et al.* 2005). A peste está incluída, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre as doenças re-emergentes, em vista da ocorrência de epidemias em vários países (WHO 2004). Cepas apresentando multiresistência (Galimand *et al.* 1997) e novos ribotipos (Guiyoule *et al.* 1997) têm surgido além de ter grande importância como instrumento de terrorismo biológico (Inglesby *et al.* 2000).

No Brasil a doença persiste em focos naturais, principalmente na região Nordeste, exigindo ações permanentes de vigilância e controle (Vieira and Coelho 1998; Almeida *et al.* 1985). A peste foi registrada pela primeira vez, no estado da Paraíba em 1912. A zoonose disseminou-se pela zona rural e fixou-se em duas áreas independentes: nos municípios de Manaíra e Princesa Isabel, que junto com o município de triunfo (Pernambuco) formam o foco de Triunfo. A outra área forma o foco que se estende pelo Planalto da Borborema, abrangendo vários municípios dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas (Baltazard 1968). Almeida *et al.* (1985) detectaram atividade pestosa em roedores e suas pulgas associadas à infecção humana, no foco de Triunfo, e em roedores, na ausência de casos humanos, no Foco do Planalto da Borborema. Em setembro de 1986 ocorreu um surto de peste humana na área paraibana do foco do planalto da Borborema atingindo vários municípios e foram isoladas cepas de humanos e roedores (Almeida *et al.* 1989).

Métodos fenotípicos têm identificado as cepas de *Y. pestis* como muito homogêneas, caracterizando-se por apresentar apenas um sorotipo, um fagotipo e três biovars (Perry and Fetherston 1997). Estes fenótipos oferecem limitada informação para o acompanhamento da origem de um organismo. Entretanto, métodos moleculares em conjunto com dados epidemiológicos podem detectar a origem da infecção e acompanhar as rotas de dispersão (Tenover *et al.* 1995).

Diferentes métodos moleculares (PCR-ribotipagem, RAPD, IS100, perfil plasmidial) têm sido aplicados em estudos epidemiológicos moleculares em cepas de *Y. pestis* isoladas de focos de peste no Nordeste do Brasil. No entanto, os métodos utilizados apresentaram um baixo poder discriminatório, revelando na

maioria deles um padrão genômico idêntico entre cepas oriundas de diferentes fontes e local de isolamento, demonstrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos (Leal 1998; Sobreira 2002).

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), separa fragmentos grandes de DNA após clivagem com endonucleases de restrição (Smith and Condemine 1990), analisa todo o genoma do organismo e permite agrupar os isolados, evidenciando as variações genômicas, permitindo a identificação individual dos isolados através da comparação do padrão de macrorestrição. Embora seja um método considerado “padrão ouro” para tipagem epidemiológica de muitas bactérias (Barrett *et al.* 1994; Mahalingam *et al.* 1994; Fitzgerald *et al.* 2001), estudos relacionados com a *Y. pestis* ainda são limitados.

Neste trabalho foi realizada a padronização do PFGE e avaliação desta técnica para discriminação das cepas brasileiras de *Y. pestis* por comparação dos padrões de macrorestrição e correlação com os dados epidemiológicos com o objetivo de desenvolver um método de genotipagem adequado para comparação dos isolados brasileiros que pode ser útil para acompanhar o surgimento de uma nova cepa e determinar a origem dos isolados.

Materiais e Métodos

Cepas de *Y. pestis* e condições de crescimento

Para a padronização da técnica do PFGE foram estudadas 43 cepas de *Y. pestis*, sendo 36 isoladas de diferentes fontes, anos e locais de isolamento, incluindo 22 cepas de *Y. pestis* obtidas antes e durante o surto de peste ocorrido no Estado da Paraíba para avaliação do PFGE (Almeida *et al.* 1989), tabela 1. As cepas estudadas estavam mantidas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste (SRP) do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM-Fiocruz.

As cepas foram reativadas para os trabalhos em BHI – Brain Heart Infusion Broth (Difco), acondicionadas a 28°C por 24h e em seguida plaqueadas em meio BAB - Blood Agar Base (Difco). A prova de identificação das cepas de *Y. pestis* foi realizada utilizando o bacteriófago específico antipestoso. As cepas brasileiras de *Y. pestis* foram identificadas com a denominação de P (peste) e receberam a

identificação do estado de origem seguido da seqüência do número dos isolados do Plano Piloto de peste (Almeida *et al.* 1985).

Padronização da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado – Sistema PFGE

A técnica do PFGE foi padronizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo CDC – USA, com algumas modificações realizadas nas diferentes etapas do procedimento. Foram retiradas colônias isoladas crescidas em placas de BAB por 48h e preparado à suspensão bacteriana, medida em espectofotômetro com comprimento de onda de 600nm e absorvância entre 0,9-2,0. Os moldes de agarose (*plugs*), contendo a cultura, foram preparados em concentrações de 1% a 2% testando-se as agaroses *Low Melting* (Invitrogen), *Seakem Gold* e agarose da Bio-Rad. A etapa de lise celular nos *plugs* de agarose foi realizada com proteinase K (20mg/mL), variando o tempo de incubação entre 2 e 18 horas. Para obter o perfil de macrorestrição foram analisadas as enzimas de restrição; *NotI*, *XbaI* e *Ascl* utilizando o sistema CHEF-DR III (Bio-Rad). Para a análise com a enzima *NotI* foi testada a concentração de 10U, com incubação variando de 6, 18 e 21 horas a 37°C. Para a enzima *XbaI*, foram testadas as concentrações de 10U, 20U e 40U, com tempo de incubação entre 4, 18 e 21 horas a 37°C. A enzima *Ascl* foi avaliada com concentrações de 10U e 20U por 18 horas a 37°C. A etapa de montagem do gel de agarose para corrida eletroforética foi realizada inicialmente com agarose *Low Melting* (Invitrogen) a 1% em TBE 0,5X, em seguida avaliou-se a agarose *Pulsed Field Certified* da Bio-Rad a 1% e por fim foi testada a agarose *Seakem Gold* a 1%. Esta agarose é utilizada em inúmeros artigos relacionados com o PFGE. As condições eletroforéticas para separação das bandas menores variaram de 1,8s-2,2s e o tempo final para separação das bandas maiores variou entre 18,7s - 35,1s. A miliamperagem utilizada para as corridas ficou compreendida de 4,5V/cm - 6,0V/cm, correspondendo, aproximadamente a 140-300V. O tempo de corrida variou de 18-21 horas. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (1mg/mL) e as imagens capturadas sob iluminação UV usando o 1D Image Analysis software, versão 3.5 (Kodak Digital Science). O Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) foi empregado como marcador de peso molecular.

Análise dos dados do PFGE

As cepas de *Y. pestis* foram distribuídas em grupos de cepas idênticas ou relacionadas de acordo com o padrão de bandas produzidas. O esquema utilizado por Tenover *et al* (1995) foi empregado para diferenciar as cepas como indistinguíveis (nenhuma banda de diferença), intimamente relacionadas (1-3 bandas diferentes), possivelmente relacionadas (4-6 bandas de diferença) e não relacionadas ou diferentes (mais que seis bandas de diferença). O grau de homologia entre as amostras tipadas pela técnica de PFGE, foi determinado pelo coeficiente de Dice (Dice 1945) e a correlação para agrupamento foi calculada pelo algoritmo UPGMA. Para representação hierárquica das ligações entre os isolados, foi desenhado um dendrograma pelo programa *Bionumerics software* (Applied Maths, Bélgica) com otimização de 0.40% e tolerância de 1.5%.

Análise do poder discriminatório

O poder discriminatório do PFGE foi determinado de acordo com o índice numérico descrito por Hunter and 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.

Resultados e Discussão

Algumas bactérias patogênicas, como a *Y. pestis*, são geneticamente homogêneas, apresentando dificuldades na discriminação das cepas (Achtman *et al.* 1999). Entre muitos métodos moleculares já avaliados, a análise da macrorestrição pelo PFGE tem mostrado ser útil para o agrupamento e diferenciação de muitas bactérias patogênicas (Barrett *et al.* 1994; Fitzgerald *et al.* 2001; Mahalingam *et al.* 1994).

A proposta do presente trabalho foi padronizar e avaliar uma ferramenta molecular para ser aplicada em estudos epidemiológicos de cepas brasileiras de *Y. pestis*. A caracterização dos isolados é de fundamental importância em estudos

epidemiológicos, que auxilia no rastreamento e disseminação do patógeno (Tenover *et al.* 1995). Importantes decisões de saúde pública em relação a medidas preventivas são baseadas, primeiramente, em dados de tipagem molecular (CDC 1995).

Padronização do sistema PFGE

A primeira parte deste estudo foi padronizar e desenvolver um protocolo de análise epidemiológica para cepas brasileiras de *Y. pestis*, antes consideradas como cepas homogêneas e indistinguíveis por outros métodos moleculares. Durante a padronização foram analisadas cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes, locais e datas de isolamento para adequar os padrões e reprodutibilidade da técnica.

Suspensão, Lise Celular e Lavagem dos plugs: As células bacterianas foram ressuspendidas em tampão de suspensão celular (CSB) e ajustada à absorbância em 1,0 utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. Para obtenção dos *plugs*, foi acrescido à suspensão bacteriana 400ul de agarose Bio-Rad 2% e 20ul de Proteinase K. A lise celular ocorreu por 2 horas a 54°C, submersos na solução de lise. Os *plugs* foram lavados, com água miliQ e TE autoclavados e pré-aquecidos.

Digestão do DNA genômico com endonucleases de restrição: Para cada digestão, foram utilizados 1/3 (3mm) de cada *plug* recortado com bisturi. Os *plugs* foram submetidos a um período de pré-restrição de 10 min a 37°C. Inicialmente foram usadas para gerar padrões de restrição genômico nas cepas de *Y. pestis* três enzimas de restrição; *NotI*, *XbaI* e *AsclI*. No entanto a enzima *AsclI* gerou um perfil de bandas de mais fácil análise pelos padrões PFGE obtidos para *Y. pestis*.

Eletroforese: A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose 1% *Seakem Gold* em tampão TBE 0,5X e realizada no sistema CHEF III (*Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields/Bio-Rad*), sob voltagem de 4,5V/cm a 14°C por 21 horas. A agarose *Seakem Gold* demonstrou melhor resolução dos padrões de restrição que as demais agaroses testadas. Após a coloração com brometo de etídio, o gel foi visualizado em transiluminador de UV e digitalizado pelo 1D Image Analysis software, em câmara Kodak. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular DNA Ladder PFGE

(figura 1). Esta é a primeira descrição da aplicação do PFGE em cepas brasileiras de *Y. pestis* e que o resultado é obtido a partir do protocolo realizado em 72 horas. O uso deste protocolo padronizado de PFGE para tipagem de cepas brasileiras de *Y. pestis* permite que o laboratório de peste possa tipar os isolados em poucos dias, permitindo auxiliar na identificação da fonte responsável pela infecção.

Avaliação do PFGE para genotipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis*

A segunda etapa deste estudo foi avaliar a capacidade da técnica PFGE em tipar as cepas brasileiras de *Y. pestis*. O método de tipagem demonstrado investigou padrões genômicos, que apresentaram níveis de variabilidade que contribuirão para análise e reconhecimento do genoma dessa espécie em estudos posteriores.

Neste trabalho, 22 cepas de *Y. pestis*, isoladas antes e durante um surto ocorrido em 1986 no estado da Paraíba, foram analisadas pelo PFGE através da enzima *Ascl*. A tipagem pelo PFGE mostrou um grau de variabilidade nos padrões de macrorestrição, permitindo distribuí-las em 19 genótipos, resultando em um alto poder discriminatório ($D=0.93$). Hunter and Gaston (1998) consideram um índice maior que 0.90 como sendo confiante e, portanto desejável.

O PFGE mostrou um padrão de macrorestrição genômica obtido pela *Ascl*, de 17–24 fragmentos, sendo considerado apenas os fragmentos de tamanhos entre ~48.5 e ~300kb para comparação entre os perfis obtidos (figura 2). Após análise do dendrograma com uma similaridade de 70% foram identificados dois ramos distintos. Ao considerar um ponto de corte de 80%, oito grupos foram obtidos, denominados de A-H. O primeiro ramo abrangeu sete amostras de *Y. pestis* distribuídas em dois grupos denominados de A e B, com apenas uma amostra isolada de humano. Neste ramo apenas uma cepa não foi isolada durante o surto de 1986. No segundo ramo, 13 perfis foram distribuídos em seis grupos (C-H) por diferirem em pelo menos uma banda. Este grupo compreendeu o maior número de isolados. Apenas um grupo (H), incluiu apenas um isolado. Considerando 15 amostras, onde quatro foram isolados antes do surto de 1986, entre elas 14 foram isoladas de roedores e apenas uma foi isolada de humano (figura 2).

Os grupos B, C e D incluíram cepas isoladas durante o surto de 1986, porém obtidas de diferentes sítios (figura 2), fortalecendo assim a interferência geográfica observada nos padrões gerados pelo PFGE.

Apenas um isolado do Sítio Pedra d'água, de 1986, cepa P.PB 871, não foi agrupada juntamente com outras cepas de mesma origem (figura 2). Estudos futuros serão necessários para determinar os fatores ambientais envolvidos nas mudanças genóticas observados em diferentes cepas de *Y. pestis*. Segundo Huang *et al.* (2002), os padrões obtidos de *Y. pestis* podem ser gerados independentemente pelo fato de várias cepas isoladas de uma mesma fonte epidemiológica mostrarem diferentes níveis de homologia. Amostras de *Y. pestis* isoladas de *Oryzomys subflavus* foram incluídas em dois grupos (A e D). Isolados de *Rattus rattus* distribuídos em cinco grupos (A, B, C, F, G) e isolados de *Bolomys lasiurus* incluídos em seis grupos (B, C, E, F, G, H), figura 2 e tabela 1.

Entretanto, analisando os padrões de macrorestrição entre os isolados dos oito grupos encontrados pelo PFGE, foi possível estabelecer uma relação genética entre os isolados estudados por se diferenciarem em apenas duas a três bandas (figura 2). Segundo Tenover (1995), isolados bacterianos diferenciados por um simples evento genético, refletindo em uma diferença de uma a três bandas, são intimamente relacionadas, conseqüentemente, isolados provavelmente pertencentes ao mesmo surto.

Além disso, estudos anteriores realizados pelo PFGE com cepas de *Y. pestis* isoladas nos Estados Unidos demonstraram que variações de duas a três bandas são observadas apenas em cepas da mesma espécie quando estas são cultivadas repetidamente ou repicadas múltiplas vezes, mas de uma mesma cepa parental (Huang *et al.* 2002).

O resultado obtido pode sugerir que um número limitado de rearranjos ocorreu dentro do genoma da *Y. pestis* e que isto gerou padrões de restrição diferenciados. A íntima proximidade geográfica das localidades dos municípios também pode explicar a baixa diversidade encontrada.

Os resultados obtidos pelo PFGE também demonstraram que as cepas responsáveis pelo surto de 1986 pertenceram ao mesmo grupo genético das cepas isoladas em período anterior ao surto na Paraíba e que estes mesmos clones circulam no homem e em diferentes espécies de roedores (*O. subflavus*, *B. lasiurus*, *R. rattus*, *H. sciureus*). Uma possível explicação estaria relacionada ao ciclo epidemiológico da peste, que é uma zoonose de roedores, e que o homem se

contamina ao se expor ao ecossistema da infecção (Perry and Fetherston 1997). Esta relação sugere a permanência de clones circulando na região em épocas anteriores ao surto, mesmo depois de alguns anos de quiescência da peste.

Resultados anteriores (Oliveira *et al.* 2006) reforçam os achados obtidos neste estudo, com as cepas de *Y. pestis* isoladas durante o surto de 1986, quando investigadas com outra ferramenta molecular, o MLVA (Análise dos VNTRs), através da análise de seis *loci* VNTRs. O MLVA permitiu distribuir as 19 cepas do surto de 1986 em seis perfis genotípicos que foram encontrados nas cepas de alguma espécie de roedor, e as cepas de origem humana foram enquadradas em dois perfis. Estes dois perfis também foram encontrados no *B. lasiurus*. O MLVA, aplicado em cepas brasileiras de *Y. pestis* (Oliveira *et al.* 2006), e a análise do PFGE deste estudo permitiram encontrar o mesmo perfil genotípico em cepas isoladas de diferentes sítios e municípios e por outro lado, cepas originadas da mesma fonte como as dos *R. rattus* com grande variedade de perfis genotípicos. A identificação de diferentes genótipos em cepas isoladas de uma mesma área geográfica, ano e fonte de isolamento sugere que populações distintas de *Y. pestis* circulavam na área de foco durante o surto de 1986.

Leal *et al.* (1999, 2000) e Leal-Balbino *et al.* (2004) observaram alterações no genoma (plasmidiais e cromossomais) em cepas brasileiras de *Y. pestis* quando estocadas e manipuladas no laboratório. Diante disto, pode-se supor que as variações observadas nas cepas do surto da Paraíba poderiam ter sido resultado de alterações *in vitro*. No entanto, análises realizadas por Oliveira (2006) através do VNTR em cepas parentais e nas culturas derivadas das cepas P.CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 não detectou modificações nesses *loci*, demonstrando que não houve variações *in vitro*.

Os resultados obtidos neste estudo, bem como outros trabalhos (Najdenski *et al.* 1994), indicam que o genoma da *Y. pestis* é geralmente instável ao nível de macrorestrição. Esta variabilidade pode ser útil para determinação precisa da origem de uma cepa (Huang *et al.* 2002).

Em conclusão, os resultados encontrados demonstraram que o PFGE é uma ferramenta eficiente na discriminação das cepas de *Y. pestis* isoladas do Nordeste brasileiro. A combinação de técnicas de tipagem que analisam regiões específicas do genoma bacteriano (VNTR) pode aumentar a capacidade discriminatória de traçar a origem das cepas.

Tabela 1. Características das cepas *Y. pestis* estudadas.

CEPAS	ORIGEM			
	FONTE	MUNICÍPIO	SÍTIO	ANO
P.PB 817*	OS	Natuba-PB	Estivas	1979
P.PB 820*	BL	Natuba-PB	Tauá	1979
P.PB 843*	BL	Natuba-PB	Salgadinho	1980
P.PB 851*	BL	Natuba-PB	Gitó	1980
P.PB 860*	BL	Salgado de São Félix –PB	Engenho Covão	1982
P.PB 862	H	Solânea-PB	Pedra D'Água	1986
P.PB 864	RR	Solânea-PB	Pedra D'Água	1986
P.PB 866	RR	Solânea-PB	Valério	1986
P.PB 867*	BL	Solânea-PB	Lagoa do Serrote	1986
P.PB 868*	BL	Solânea-PB	Cinco estrelas	1986
P.PB 869*	HS	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 870	BL	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 871*	BL	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 872	BL	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 873*	OS	Solânea-PB	Sete Lagoas	1986
P.PB 874	RR	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 876*	RR	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 877*	RR	Solânea-PB	Cinco Lagoas	1986
P.PB 878*	OS	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 879*	OS	Solânea-PB	Pedra D'agua	1986
P.PB 880*	OS	Solânea-PB	Bacalhau	1986
P.PB 881*	H	Remígio-PB	Serrinha	1986
P.CE 21 *	H	Ipu-CE	Baixinha	1982
P.CE 882*	H	Ipu-CE	Ipuzinho	1997
P.EXU 554*	H	São Benedito-CE	Pimenteira	1971
P.EXU 15*	H	Exu-PE	Retiro	1966
P.EXU 16*	H	São José do Belmonte-PE	Minador	1966
P.EXU 248*	H	São José do Belmonte-PE	Baixa Verde	1968
P.EXU 249*	H	São José do Belmonte-PE	Bananeira	1968
P.EXU 292*	H	São José do Belmonte-PE	Mata Redonda	1968
P.EXU 312*	H	Exu-PE	Badreci	1969
P.EXU 334*	H	Exu-PE	Gambá	1969
P.EXU 340/I	H	Ipubi-PE	Serra Antônio Barbosa	1969
P.EXU 351*	H	Triunfo-PE	Batinga	1969
P.EXU 674*	H	Exu-PE	Brejo de Santo Inácio	1974
P.EXU 738*	H	Araripina-PE	Cansação	1975
P.EXU 769*	H	Ipubi-PE	Cacimbinha	1975
P.EXU 771*	H	Araripina-PE	Serra Antônio Domingo	1975
P.EXU 781*	H	Granito-PE	Catumbi	1975
P.EXU 788*	PJ	Araripina-PE	Alto Alegre	1977
P.EXU 825*	PJ	Tacaimbó-PE	Paulista	1979
P.EXU 827*	PJ	São Caetano-PE	Campo Alegre	1979
P.EXU 841*	H	Manaíra-PB	Fazenda	1979

OS: *Oryzomys subflavus*; BL: *Bolomys lasiurus*; RR: *Rattus rattus*; H: humano; HS: *Holochilus sciureus*; PJ: *Polygenis jordani* * Cepas utilizadas para padronização

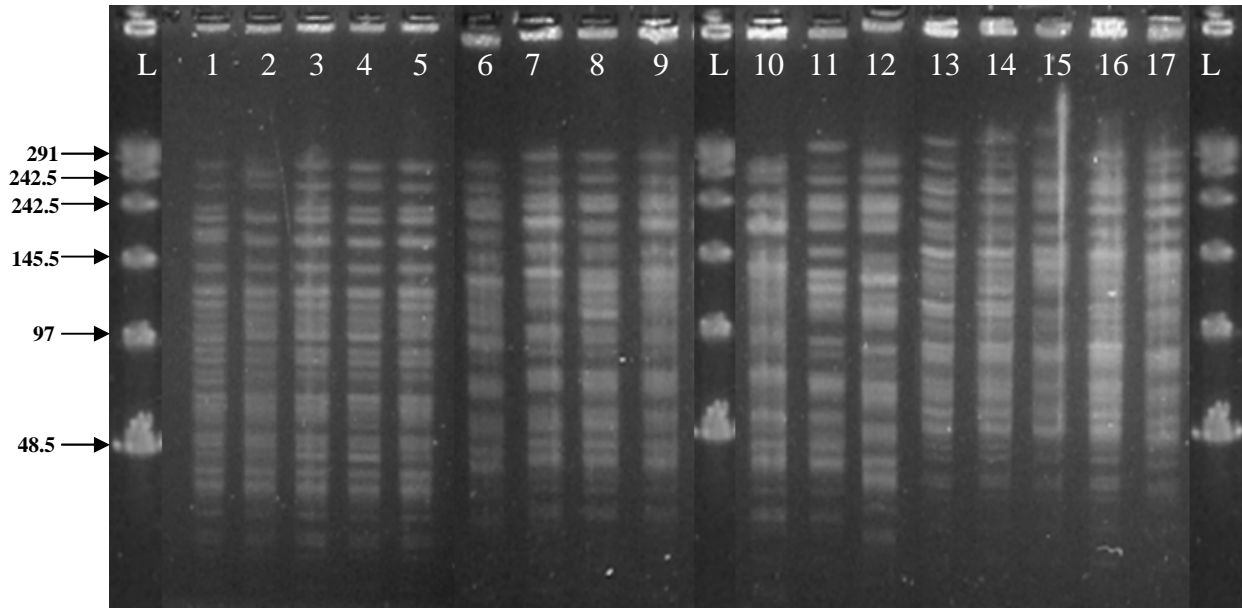


Figura 1. PFGE em gel a 1% de agarose *Seakem Gold* corrido em sistema CHEF III sob voltagem de 4,5V/cm a 14°C por 21 hora s e clivado com a enzima *Ascl*: L - DNA Ladder PFGE (Kb), **1** – P.PB 873, **2** – P.PB 877, **3** – P.PB 878, **4** – P.PB 879, **5** – P.PB 880, **6** – P.PB 843, **7** – P.PB 851, **8** – P.PB 860, **9** – P.PB 866, L - DNA Ladder PFGE, **10** – P.PB 867, **11** – P.PB 869, **12** – P.PB 876, **13** – P.PB 817, **14** – P.PB 820, **15** – P.PB 864, **16** – P.PB 871, **17** – P.PB 872, L - DNA Ladder PFGE.

Tipagem PFGE

Tipagem PFGE

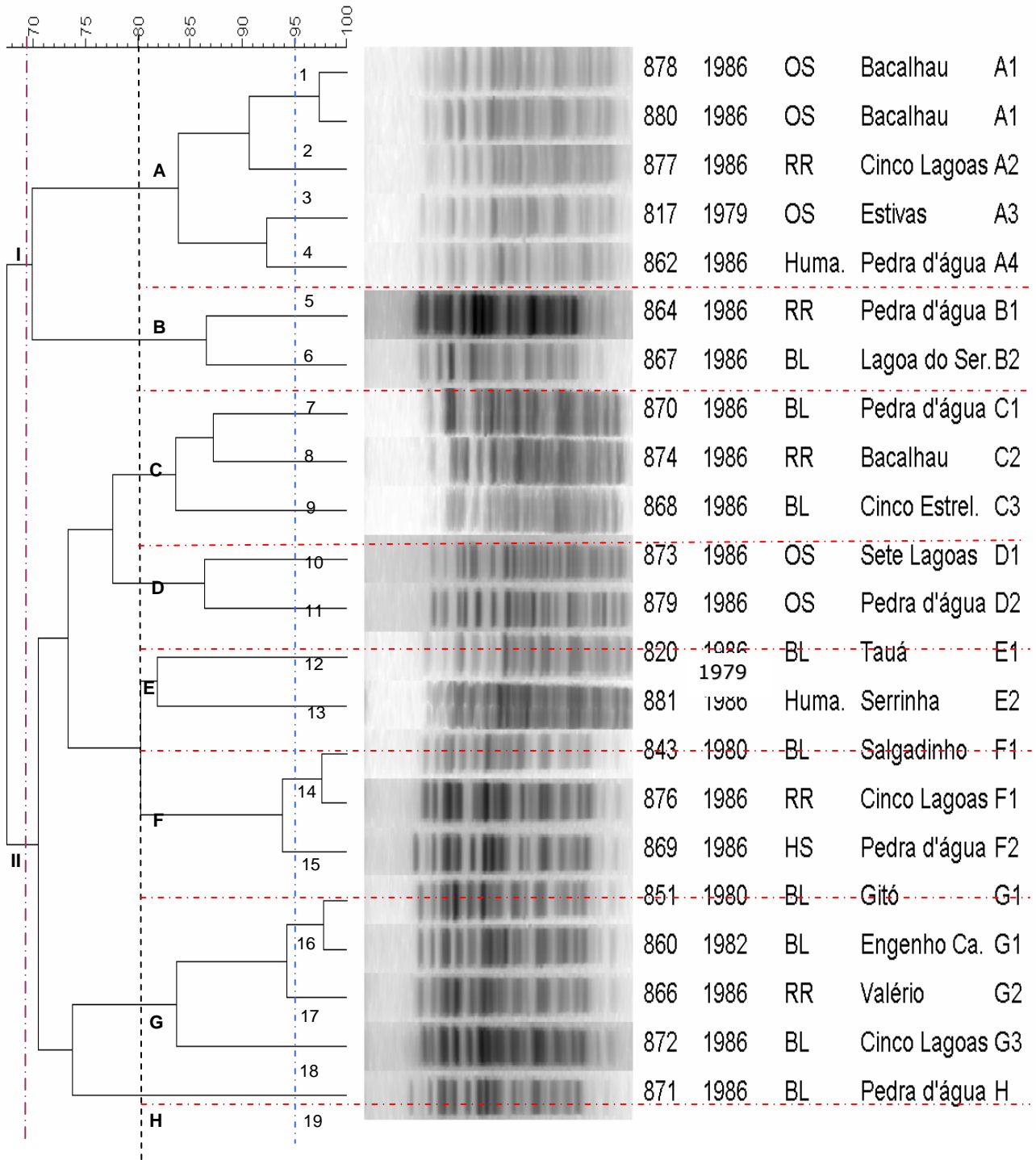


Figura 2. Dendrograma gerado pela análise do PFGE usando o Dice/UPGMA pelo programa Bionumerics/Applied Maths,. O DNA cromossômico dos 22 isolados foram clivados com a endonuclease de restrição Ascl. Os padrões foram ordenados do mais similar (de cima para baixo) ao menos similar. Os perfis são marcados a esquerda com números e os grupos a 80% de similaridade são descritos com letras do alfabeto.

Referências

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. PNAS **96**, 14043 – 14048..

Almeida, A.M.P., Brasil, D.P., Carvalho, F.G., Almeida, C.R. (1985) Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos de peste no Nordeste do Brasil de 1966 a 1982. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **27**, 207-218.

Almeida, A.M.P., Brasil, D.P., Leal, N.C., Melo, M.E.B., Rego, R.V.B., Carvalho, F.G., Almeida, C.R. (1989). Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **84**, 249-256.

Almeida, A.M.P., Tavares, C., Leal-Balbino, T. C. (2005) Peste. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias **2**, Cap. 126, 1509-1522.

Baltazard, M. (1968) Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais **20**, 335-366.

Barrett, T.J., Lior, H., Green, J.H., Khakhria, R., Wells, J.G., Bell, B.P., Greene, K.D., Lewis, J., Griffin, P.M. (1994) Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. Journal of Clinical Microbiology **32**, 3013-3017.

Centers for Disease Control and Prevention. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly report **44**, 157–160.

Dice, L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. Ecology **26**, 379-393.

Fitzgerald, C., Helsel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J., Fields, P.I. (2001) Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter*

jejuni during an outbreak involving a food handler. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2386-2390.

Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E., Courvalin, P. (1997) Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *The New England Journal of Medicine* **337**, 677-680.

Guiyoule, A., Rasoamanana, B., Buchrieser, C., Michel, P., Chanteau, S., Carniel, E. (1997) Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2826-2833.

Huang, X.Z., Chu, M.C., Engelthaler, D.M., Lindler, L.E. (2002) Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1164-1173.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 2465-2466.

Inglesby, T.V., Dennis, D.T., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Koerner, J.F., Layton, M., Mcdade, J., Osterholm, M.T., O'toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Schoch-Spana, M., Tonat, K. (2000) Plague as a biological weapon. *Jama* **283**, 2281-2290.

Leal, N.C. (1998) Potencial do uso de PCR e Hibridização com Sondas Moleculares no estudo da *Yersinia pestis*. Tese de Doutorado.

Leal, N.C., Almeida, A.M.P. (1999) Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **41**, 339-342.

Leal, N.C., Sobreira, M., Leal, T.C.A., Almeida, A.M.P. (2000) Homology among extra-cryptic DNA bands and typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis*. *Brazilian Journal Microbiology* **31**, 20-24.

Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Lopes, C.V., Almeida, A.M. (2004) Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 727-32.

Mahalingam, S., Cheong, Y.M., Kan, S., Yassin, R.M., Vadivelu, J., Pang, T. (1994) Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal Clinical Microbiology* **32**, 2975-2979.

Najdenski, H., Itean, I., Carniel, E. (1995) The genome of *Yersinia enterocolitica* is the most stable of the three pathogenic species. *Contributions to Microbiology and Immunology* **13**, 281-284.

Oliveira, M.B.M. (2006) 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* **48**.

Perry, R., Fetherston, J.D. (1997) *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 35-66.

Smith, C.L., Condemine, G. (1990) New approaches for physical mapping of small genomes. *Journal of Bacteriology* **172**, 1167-1172.

Sobreira, M. (2002) Análise das Regiões Espaçadoras Intergênicas do rRNA 16S-23S em Diferentes Gêneros Bacterianos. Tese de Doutorado em Genética, UFPE.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal Clinical Microbiology* **9**, 2233-2239.

Vieira, J.B., Coelho, G.E. (1998) Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*, **31**, 113-119.

WHO. Human plague in 2002 and 2003. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v.79, n. 33, p. 301-308, 2004.