

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

Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins

**Avaliação dos locos CRISPR (Clustered Regularly
Interspaced Short Palindromic Repeats) em estudos
epidemiológicos de cepas de *Yersinia pestis***

RECIFE

2011

ROSANNY HOLANDA FREITAS BENEVIDES LINS

**AVALIAÇÃO DOS LOCOS CRISPR (CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED
SHORT PALINDROMIC REPEATS) EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE
CEPAS DE *Yersinia pestis***

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

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Co-Orientadora: Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife, 2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- L759a Lins, Rosanny Holanda Freitas Benevides.
Avaliação dos locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) em estudos epidemiológicos de cepas de *Yersinia pestis*. / Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins. — Recife: R. H. F. B. Lins, 2011.
93 p.: ilus. ,tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
- Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino.
Co-orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida.
1. *Yersinia pestis*. 2. Peste. 3. Estudos Epidemiológicos. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Almeida, Alzira Maria Paiva de. III. Título.

CDU 616.98

ROSANNY HOLANDA FREITAS BENEVIDES LINS

**AVALIAÇÃO DOS LOCOS CRISPR (CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED
SHORT PALINDROMIC REPEATS) EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE
CEPAS DE *Yersinia pestis***

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

Aprovado em: 05/08/11

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Microbiologia

Membro Externo / Titular: Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Microbiologia

Membro Interno / Titular: Dra. Janaína Campos de Miranda
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Microbiologia

Dedico este trabalho aos que
sempre acreditaram em mim, e em
especial às pessoas mais
importantes da minha vida: minha
mãe Anita, meu marido Artur e
minha filha Luísa.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Tereza Cristina Leal Balbino, toda minha gratidão e admiração pela capacidade de enxergar o aluno como uma pessoa e não como uma “máquina de fazer experimentos e mostrar resultados”. Ela está comigo desde o início da minha vida científica e seu carinho, paciência, apoio e oportunidade foram SEMPRE fundamentais para que eu continuasse.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia, em especial a Carina Mendes, Lívia Alves, Mariana Andrade, Maria Paloma e Vladimir Silveira, pela eterna disponibilidade em ajudar, além da amizade que extrapola as bancadas, estando presentes em muitos outros momentos importantes da minha vida.

À Fernanda Pimentel, sempre tão solícita. Perco as contas de quantas vezes me ajudou dando dicas preciosas que parece que só ela tem pra dar.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo suporte científico e financeiro.

Aos membros da banca examinadora que se mostraram disponíveis desde o primeiro momento apesar da urgência com que foram solicitados.

À minha família que está sempre na torcida pelo meu sucesso. Em especial a minha mãe que nunca mediu esforços para atender meus desejos e necessidades, principalmente quando o assunto é educação. Aos meus irmãos Fred e Breno por me ajudarem sempre que preciso. Ao meu marido Artur, que amo muito e diariamente me mostra o verdadeiro significado da palavra “companheiro”. Sem esquecer a minha pequena Luísa que não entende nada do meu trabalho, mas me ajuda tornando suportáveis aqueles dias em que nada dá certo.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, mesmo não citados são igualmente importantes.

Lins, Rosanny H. F. B. **Avaliação dos locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) em estudos epidemiológicos de cepas de *Yersinia pestis*.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

Yersinia pestis é o agente causador da peste, doença primária de roedores, transmitida por pulgas infectadas, podendo infectar o homem e outros mamíferos. A maioria dos estudos de genotipagem realizada em cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstrou baixo poder discriminatório, revelando padrões genotípicos semelhantes para cepas com diferentes características epidemiológicas. A análise do “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (CRISPR) vem sendo utilizada para genotipagem e estudos filogenéticos em diferentes gêneros bacterianos, inclusive de *Y. pestis*. Neste estudo foi realizada a genotipagem de cepas de *Y. pestis* da coleção de cultura do Serviço Nacional de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, isoladas nos três focos de peste do Estado de Pernambuco, pela análise dos locos CRISPR. Para as amplificações das 51 amostras, foram utilizados *primers* dirigidos às sequências CRISPR descritas na literatura (YPa, YPb e YPc). Os amplicons obtidos, após PCR, foram sequenciados, a fim de analisar a estrutura de cada loco CRISPR. Dois locos se apresentaram polimórficos: YPa, com alelos de 150pb a 570pb e YPb, com alelos de 330pb a 331pb. O loco YPc se mostrou monomórfico com alelos de 208pb. Os padrões CRISPR obtidos para cepas de *Y. pestis* de focos de outros países foram os mesmos observados nas cepas brasileiras. Diferentes arranjos dos espaçadores (YPa, YPb e YPc) foram observados e possibilitou que as cepas fossem agrupadas em 12 perfis genotípicos (PG1-PG12). Dois perfis foram distribuídos nos três focos estudados: PG1 perfil mais frequente (38 cepas) e PG3 (seis cepas). Os demais perfis foram específicos de uma determinada região de isolamento: PG2 para o foco de Triunfo e PG4-PG7 para o foco de Araripe. Os perfis PG8 a PG12 representaram o restante das cepas de focos de outros países. As mesmas cepas foram analisadas, anteriormente, através de onze locos VNTR (MLVA), e foram agrupadas em 35 perfis genotípicos. A menor diversidade observada no CRISPR ocorre, provavelmente, devido à região estar envolvida na codificação gênica e com maior pressão seletiva, portanto, com menor risco de sofrer mutação decorrente de estocagem. A análise dos locos CRISPR, complementar ao uso do MLVA, será útil na identificação e rastreamento de novas cepas, contribuindo para o estabelecimento de medidas de controle adequadas nas áreas de foco para prevenção da peste e na investigação de novos casos que possam surgir no Brasil.

Palavras chave: *Yersinia pestis*, peste, estudos epidemiológicos.

Lins, Rosanny H. F. B. **Avaliação dos locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) em estudos epidemiológicos de cepas de *Yersinia pestis*.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Yersinia pestis is the causative agent of plague, primary disease of rodents transmitted by infected fleas that can infect humans and other mammals. Most genotyping studies conducted in Brazilian strains of *Y. pestis* showed low discriminatory power, revealing patterns similar genotypic strains with different epidemiological characteristics. The analysis of the "clustered regularly interspaced short palindromic repeats" (CRISPR) has been used for typing and phylogenetic studies in different bacterial genera, including the characterization of *Y. pestis*. This study was performed genotyping of strains of *Y. pestis* the culture collection of the National Pest Reference in Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ, isolated from three foci of plague in State of Pernambuco, through the analysis of CRISPR loci. For amplifications of the 51 samples, we used primers directed to CRISPR sequences described in the literature (YPa, YPb and YPc). The amplicons obtained after PCR were sequenced in order to analyze the structure of each CRISPR locus. Two loci displayed polymorphism: YPa, with alleles of the 150pb – 570pb, and YPb of the 330pb – 331pb. The YPc proved monomorphic locus with alleles of 208Pb. CRISPR patterns obtained for strains of *Y. pestis* in other countries foci were the same as those observed in the Brazilian strains: YPa and YPb polymorphic and YPc monomorphic. The different arrangements of the spacers (YPa, YPb and YPc) were observed and enabled the strains to be grouped into 12 genotypic profiles (PG1-PG12). Two profiles were distributed in three areas studied: PG1 profile more frequent (38 strains) and PG3 (six strains). The other profiles were specific to a particular region of isolation: PG2 for focus of Triunfo and PG4-PG7 for focus of Araripe. The profiles PG8 to PG12 represented the rest of the strains of foci in other countries. The same strains were analyzed previously in eleven VNTR (MLVA) LOCI, and were grouped into 35 genotypic profiles. The lower diversity observed in the CRISPR is probably due to the region to be involved in the encoding gene, with higher selective pressure, therefore, with less risk of mutation due to storage. The analysis of the CRISPR loci, complementary to the use of MLVA, will be useful in identifying and screening new strains, contributing to the establishment of adequate control measures in the areas of focus for prevention of plague and in the investigation of new cases that may arise in Brazil.

Keywords: *Yersinia pestis*, plague, epidemiological studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição da peste no mundo.	16
Figura 2 -	Focos de peste no Brasil.	18
Figura 3 -	Microscopia óptica da <i>Y. pestis</i> em esfregaço de sangue corado pela técnica de Giemsa.	19
Quadro 1-	Classificação dos biovars das cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	21
Figura 4 -	Ciclo epidemiológico da peste.	23
Figura 5 -	<i>Xenopsylla cheopis</i> ingurgitada com sangue.	24
Figura 6 -	Formas clínicas da peste.	26
Figura 7 -	Esquema representativo do genoma da <i>Yersinia pestis</i> .	33
Figura 8 -	Representação esquemática de um loco VNTR.	34
Figura 9 -	Representação esquemática de um loco CRISPR.	35
Figura 10 -	Esquema do mecanismo de defesa baseado no complexo CRISPR/Cas.	36
Figura 11 -	Modelo geral de prevenção auto-imune do sistema CRISPR.	37
Figura 12 -	Representação esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no genoma da <i>Y. pestis</i> .	37
Quadro 2 -	Características das cepas de <i>Yersinia pestis</i> estudadas e perfis gerados neste estudo.	48
Quadro 3 -	Dados epidemiológicos das cepas de <i>Yersinia pestis</i> de focos de outros países e perfis gerados neste estudo.	49
Quadro 4 -	Descrição dos primers utilizados no estudo e localização na cepa controle CO92 de <i>Y. pestis</i> .	50
Quadro 5 -	Condições para amplificação da PCR.	51
Figura 13 -	Gel representativo dos três locos CRISPR amplificados em cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	55
Figura 14 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPa.	58
Figura 15 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPb.	59
Figura 16 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPc.	60
Figura 17 -	Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPa nas cepas de <i>Y. pestis</i> .	61
Figura 18 -	Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPb nas cepas de <i>Y. pestis</i> .	61
Figura 19 -	Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPc nas cepas de <i>Y. pestis</i> .	62
Quadro 6 -	Estrutura das sequências das Repetições Diretas (DRs) dos locos CRISPR.	62
Figura 20 -	Representação esquemática da variação estrutural do loco YPa (A), YPb (B) e YPc (C) nas cepas brasileiras de <i>Y. pestis</i> .	64
Figura 21 -	Dendrograma de cepas de <i>Yersinia pestis</i> , sua origem e distribuição por Perfil Genotípico.	68
Figura 22 -	Distribuição geográfica dos perfis gerados pela análise dos espaçadores Região-Específicos (RSSs) nos focos de peste estudados.	69
Quadro 7 -	Estrutura e características dos espaçadores encontrados nos locos CRISPR das cepas de <i>Yersinia pestis</i> estudadas (brasileiras e de focos de outros países).	70
Figura 23 -	Distribuição alélica no loco YPa das cepas de <i>Y. pestis</i> de focos de outros países.	72

Figura 24 -	Distribuição alélica no loco YPb das cepas de <i>Y. pestis</i> de focos de outros países.	72
Figura 25 -	Distribuição alélica no loco YPc das cepas de <i>Y. pestis</i> de focos de outros países.	73
Figura 26 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPa nas cepas de <i>Y. pestis</i> de outros focos.	74
Figura 27 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPb nas cepas de <i>Y. pestis</i> de outros focos.	75
Figura 28 -	Representação das sequências nucleotídicas do loco YPc nas cepas de <i>Y. pestis</i> de outros focos.	76
Figura 29 -	Representação esquemática da variação estrutural do loco YPa (A), YPb (B) e YPc (C) nas cepas de de <i>Y. pestis</i> de focos de outros países.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos espaçadores dos locos CRISPR.	65
Tabela 2 -	Distribuição dos espaçadores de acordo com focos de peste das cepas estudadas.	66
Tabela 3 -	Dados epidemiológicos das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas em três focos do Nordeste do Brasil e Perfis Genotípicos gerados pelo MLVA* e pelo CRISPR.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAB	(<i>Blood Agar Base</i>) base para agar sangue
BHI	(<i>Brain Heart Infusion</i>) infusão de cérebro e coração
CDC	(Centers for Disease Control and Prevention) Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRISPR	(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) repetições palindrômicas curtas separadas por espaçadores
DG	Repetição degenerada
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
DR	Repetições diretas
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FNS	Fundação Nacional de Saúde
HGI	Índice Hunter Gastor
HI	(Hemagglutination Inhibition) Inibição da Hemaglutinação
IS	Sequência de Inserção
kb	quilobases (1000 pb)
MLVA	(<i>multiple locus VNTR analysis</i>) análise de múltiplos locos VNTR
pb	pares de base
pCD1 ou pYV	plasmídio das <i>Yersinias</i>
pCP1 ou pPst	plasmídio de <i>Yersinia pestis</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFGE	(Pulsed-Field Gel Electrophoresis) eletroforese em gel de campo pulsado
pMT1 ou pFra	plasmídio de <i>Yersinia pestis</i>
RAPD	(<i>Random Amplification Polymorphism DNA</i>) polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente
RFLP-IS	(<i>Restriction Fragment Length Polymorphism-Insertion Sequence</i>) polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição-sequências de inserção
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RSSs	(<i>Region-Specific Spacer</i>) Espaçadores Região-Específica
SRP	Serviço Nacional de Referência em Peste
SSSs	(<i>Species-Specific Spacers</i>) Espaçadores Espécie-Específico
UR	Unidade Repetitiva
VNTR	(<i>Variable Number Repeat Tandem</i>) número variável de repetições em tandem
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	16
2.1	Epidemiologia global da peste	16
2.2	Bacteriologia da peste	19
2.3	Animais reservatórios e transmissão da peste	21
2.4	Apresentações clínicas da doença	25
2.5	Diagnóstico laboratorial	27
2.5.1	Diagnóstico bacteriológico.....	27
2.5.1.1	<i>Bacterioscopia</i>	27
2.5.1.2	<i>Cultura</i>	28
2.5.2	Diagnóstico sorológico.....	28
2.5.3	Diagnóstico molecular.....	29
2.6	Tratamento, controle e prevenção da peste	29
2.7	A peste como arma biológica	31
2.8	Aspectos genéticos da <i>Yersinia pestis</i>	32
2.9	Epidemiologia molecular	38
2.9.1	Ferramentas moleculares para estudos epidemiológicos.....	38
2.9.1.1	<i>RAPD</i>	39
2.9.1.2	<i>PCR-Ribotipagem</i>	39
2.9.1.3	<i>RFLP-IS</i>	40
2.9.1.4	<i>PFGE</i>	40
2.9.1.5	<i>MLVA</i>	41
2.9.1.6	<i>CRISPR</i>	42
3	JUSTIFICATIVA	43
4	PERGUNTA CONDUTORA	44
5	HIPÓTESE	45
6	OBJETIVOS	46
6.1	Geral	46
6.2	Específicos	46
7	MATERIAL E MÉTODOS	47
7.1	Bactérias e condições de cultivo	47

7.2	Extração do DNA genômico.....	50
7.3	Tipagem molecular das cepas de <i>Yersinia pestis</i> pela análise dos locos CRISPR.....	50
7.3.1	Amplificação dos locos CRISPR nas cepas de <i>Yersinia pestis</i>	50
7.3.2	Purificação e sequenciamento dos locos CRISPR.....	52
7.3.3	Análise das sequências CRISPR.....	52
7.3.4	Comparação dos resultados CRISPR x MLVA.....	53
7.3.5	Análise discriminatória.....	53
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	54
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
9.1	Tipagem molecular das cepas brasileiras de <i>Y. pestis</i> através da análise dos locos CRISPR.....	55
a)	Caracterização estrutural das Repetições Diretas (DR) nos locos CRISPR das cepas de <i>Yersinia pestis</i>	62
b)	Caracterização das Sequências Espaçadoras CRISPR nas cepas de <i>Yersinia pestis</i>	64
9.2	Tipagem molecular de cepas de <i>Yersinia pestis</i> de focos de outros países através da análise dos locos CRISPR.....	71
9.3	Análise comparativa das técnicas CRISPR e MLVA.....	78
a)	Tipagem molecular das cepas brasileiras de <i>Yersinia pestis</i> através do MLVA.....	78
b)	Tipagem molecular das Cepas de <i>Y. pestis</i> de focos de outros países através do MLVA.....	80
9.3.1	CRISPR x MLVA.....	80
10	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Yersinia pestis*, identificada pela primeira vez por Alexandre Yersin em 1894, é o agente causador da peste, doença primária de roedores, transmitida de um animal a outro através da picada de pulgas infectadas, podendo contaminar o homem quando este entra no ecossistema da doença. A peste é frequentemente vista como um problema do passado, no entanto, continua uma ameaça em áreas onde existem roedores silvestres infectados, particularmente em países endêmicos da África, Ásia e Américas. A ocorrência de peste humana no Brasil limita-se a casos esporádicos, como dois ocorridos no Ceará, um em 1997 e outro em 2005. Embora a incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias tenham declinado nos focos do Brasil, atividade residual de peste nos animais sentinelas (cães e gatos) tem sido detectada.

As cepas de *Y. pestis* são muito homogêneas, apresentando um sorotipo, um fagotipo e quatro biotipos. Tais características fenotípicas são insuficientes para rastrear a origem de uma cepa ou detectar o surgimento de novos clones. Estudos com cepas brasileiras de *Y. pestis*, utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD, PCR-ribotipagem, perfil plasmidial, etc.), vêm sendo realizados pelo grupo de Peste do Serviço Nacional de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz). Estes revelaram um padrão genômico idêntico entre cepas oriundas de diferentes fontes e locais de isolamento. Recentemente estudos realizados pela Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA) e pela Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), no entanto, têm mostrado diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Y. pestis*.

Diante disto, conclui-se que há a necessidade de se estabelecer um ou mais sistemas de tipagem molecular para o estudo das cepas de *Y. pestis*. As análises do “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (CRISPR) o qual consiste em regiões conservadas separadas por espaçadores específicos, vem sendo utilizadas para tipagem e estudos filogenéticos em diferentes gêneros bacterianos, inclusive na caracterização de isolados de *Y. pestis* de focos de outros países. A aplicação de novas técnicas de epidemiologia molecular, como a análise dos locos CRISPR, combinadas com outras ferramentas moleculares e com as informações epidemiológicas, será útil na identificação e rastreamento de novas cepas, no estabelecimento de medidas de controle adequadas nas

áreas de foco para prevenção da peste e na investigação de novos casos que possam vir a surgir no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Epidemiologia global da peste

Os focos naturais de peste estão distribuídos na Ásia, África, América do Norte, América do Sul e Sudoeste da Europa (Figura 1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou 12.503 casos de peste humana, de 2004 a 2009, incluindo 843 mortes, registradas em vários países dos continentes Africanos, Asiático e Americano. No continente africano oito países registraram 12.209 casos, 149 casos em quatro países da Ásia e 145 casos em dois países das Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

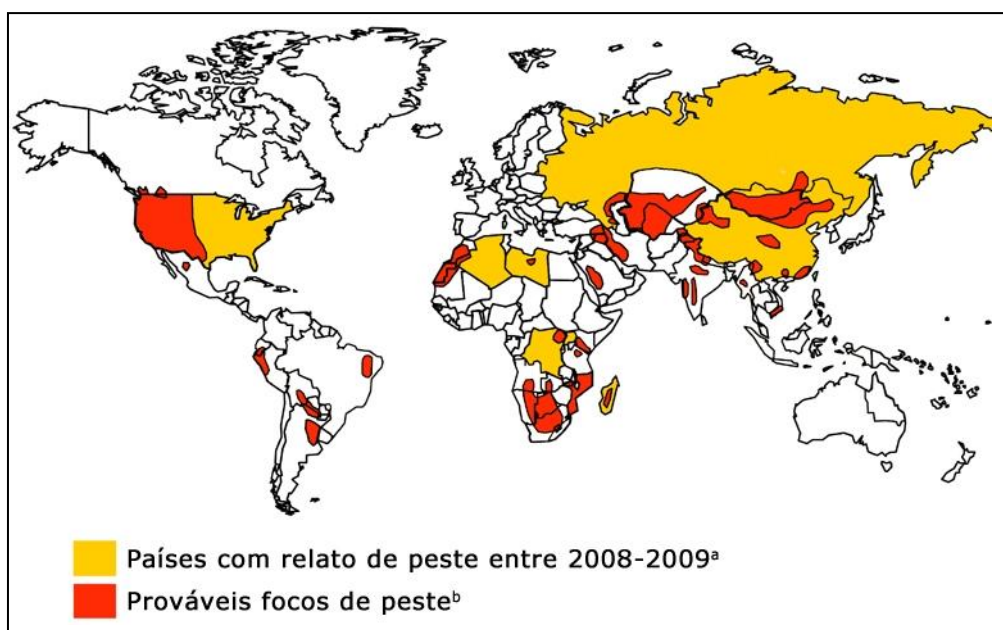


Figura 1. Distribuição da peste no mundo.

Fonte: CDC (1998); OMS (2010).

Legenda: a. OMS; b. CDC.

Nos Estados Unidos, a última epidemia de peste urbana ocorreu em Los Angeles, em 1924-1925. Desde então neste país, a peste humana tem ocorrido esporadicamente nas áreas rurais (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/epi.htm>). Entre 2004-2009, 27 casos de peste humana foram registrados, incluindo cinco mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Após os atentados terroristas ocorridos em 11 de setembro de 2001, a peste e outras doenças ganharam um novo *status*, perdendo seu rótulo de doença da pobreza. Essas doenças passaram a merecer a preocupação dos países desenvolvidos, em relação às medidas de controle contra possíveis ataques bioterroristas utilizando o bacilo da peste e outros microrganismos de rápida epidemização e grande letalidade (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005). A peste está classificada pela OMS como uma doença re-emergente e incluída na classe 3 de Biossegurança e classe A de Bioterrorismo (PRENTICE; RAHALISON, 2007), fazendo-se necessária a vigilância permanente nas áreas de foco.

Recentemente, em agosto de 2009, a China registrou um surto de peste pulmonar na cidade de Ziketan, província de Qinghai; este surto resultou em três mortes, que foram atribuídas, em grande parte, ao tratamento tardio. Segundo investigação epidemiológica, o surto se deu devido ao contato do cão do caso índice com uma marmota selvagem (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Na América do Sul, os focos naturais de peste estão distribuídos na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Peru e Venezuela. Em 2009, foi registrado um total de 128 casos de peste humana no Peru, incluindo duas mortes. Bolívia, Brasil e Equador, países com focos de peste conhecidos e que notificaram casos anteriores, não registraram episódios de peste durante este período (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Acredita-se que a peste chegou ao Brasil em 1899, no decorrer da última pandemia, através do porto de Santos. 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, formando focos esparsos em pequenos distritos, fazendas e sítios, finalmente assumindo o seu caráter de enzootia (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 1965).

Existem duas áreas principais de focos no Brasil:

1 - Focos do Nordeste: zonas pestosas do Polígono da Seca, distribuídas por vários estados do Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Piauí) e Nordeste de Minas Gerais (Vale do Jequitinhonha). Em Minas, há uma zona fora do Polígono, o Vale do Rio Doce;

2 - Foco de Teresópolis: restrito a uma pequena área da Serra dos Órgãos, nos limites dos municípios de Nova Friburgo, Sumidouro e Teresópolis-RJ.

Os focos do Nordeste têm seus centros em elevações cujas condições de temperatura, umidade, vegetação e fauna são bem diferentes das que prevalecem nas regiões circunvizinhas. São eles: focos no norte e no centro do Ceará (Serra da Ibiapaba, Serra de Baturité, Serra da Pedra Branca, Serra do Machado, Serra das Matas, Serra de Uruburetama); focos no Sul do Ceará/oeste de Pernambuco/leste do Piauí (Chapada do Araripe); foco de Triunfo (limites de Pernambuco e Paraíba); foco do Agreste (Chapada da Borborema, estendendo-se do Rio Grande do Norte a Alagoas); focos da Bahia (Planalto Oriental da Bahia, Chapada Diamantina/Piemonte da Diamantina, Planalto de Conquista, Serra do Formoso, na microrregião de Senhor do Bonfim) e Chapada do Apodi (Rio Grande do Norte, (Figura 2) (BRASIL, 2008).

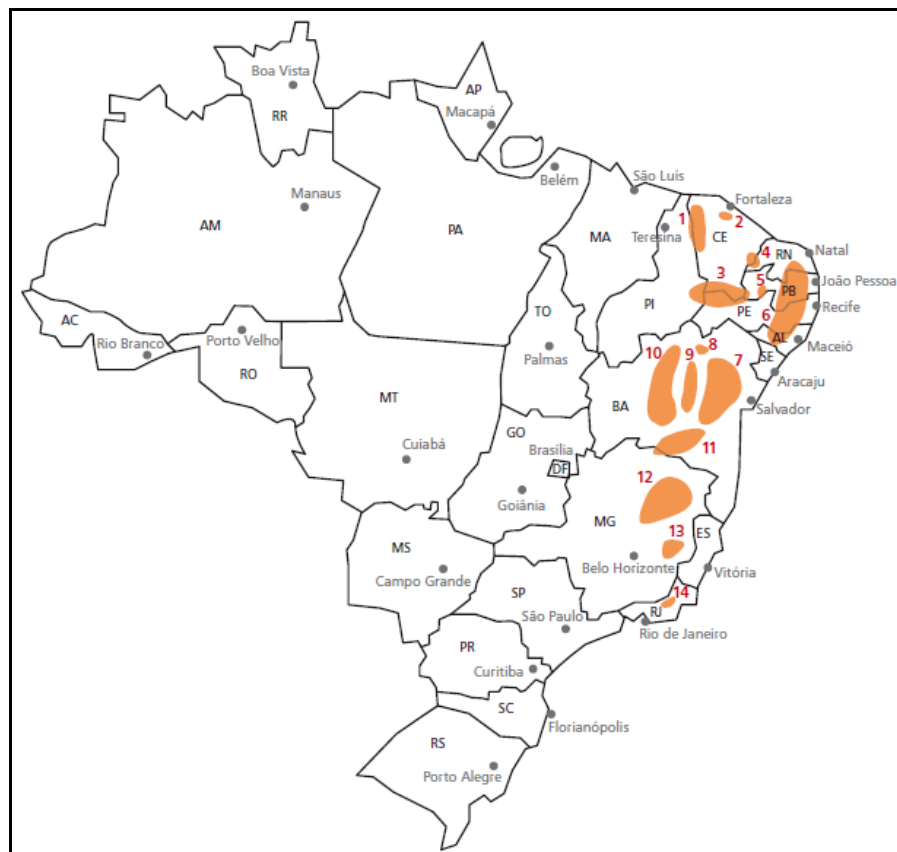


Figura 2. Focos de Peste no Brasil

Fonte: BRASIL (2008).

Legenda:

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Serra da Ibiapaba | 8. Serra do Formoso |
| 2. Serra de Baturité | 9. Piemonte da Diamantina |
| 3. Chapada do Araripe | 10. Chapada Diamantina |
| 4. Chapada do Apodi | 11. Planalto de Conquista |
| 5. Serra do Triunfo | 12. Foco do Vale do Jequitinhonha |
| 6. Chapada da Borborema/Agreste | 13. Foco do Vale do Rio Doce |
| 7. Planalto Oriental da Bahia | 14. Serra dos Órgãos |

O último surto de peste no Brasil ocorreu em 1986, no estado da Paraíba. Apesar da incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias no Brasil terem declinado nas áreas de foco do Nordeste, os inquéritos sorológicos realizados sistematicamente pelo Programa de Controle da Peste têm detectado anticorpos antipestosos em animais sentinelas (cães e gatos), principalmente nas áreas pestíferas dos estados de Pernambuco e do Ceará, confirmando a permanente circulação da *Y. pestis*. É possível que a qualquer momento, desequilíbrios ecológicos, sociais e causas ainda desconhecidas determinem seu recrudescimento, sendo o homem acometido novamente por sua forma epidêmica (ALMEIDA et al., 2007; ARAGÃO et al., 2002, 2007). Diante dessa realidade, fica claro que é equivocado acreditar que a peste é uma doença do passado.

2.2 Bacteriologia da peste

A *Y. pestis* é um membro da família Enterobacteriaceae, que se apresenta em microscopia óptica como um pequeno bacilo Gram-negativo, curto, ovóide (0,5 a 0,8 μm de diâmetro e de 1 a 3 μm de comprimento) de coloração mais acentuada nas extremidades (coloração bipolar), não forma esporos, é aeróbia ou anaeróbica facultativa, cresce bem em meios usuais a 28°C e pH entre 5 e 9. É resistente ao frio, conservando-se por longo tempo em cadáveres e também nos dejetos de pulgas (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005) (Figura 3). A *Y. pestis* é facilmente destruída pela luz solar e secagem; mesmo assim, quando lançada na atmosfera, a bactéria pode sobreviver por até uma hora, embora isso possa variar dependendo das condições (CHU, 2000).



Figura 3. Microscopia óptica da *Y. pestis* (seta) em esfregaço de sangue corado pela técnica de Giemsa. Fonte: CHU (2000).

O gênero *Yersinia* contém 14 espécies das quais nove (*Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii* e *Y. aleksiciae*) são geralmente consideradas não patogênicas aos humanos (CARNIEL, 2008; SULAKVELIDZE, 2000). Dois isolados atípicos do gênero foram incluídos como novas espécies após serem feitas análises do rRNA do gene 16S. Esses isolados foram denominados de *Y. massiliensis* e *Y. similis* (MERHEJ *et al.* 2008; SPRAGUE *et al.* 2008).

As espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são patogênicas ao homem. A *Y. pseudotuberculosis* e a *Y. enterocolitica* são bactérias enteropatogênicas, responsáveis por um quadro clínico denominado Yersiniose, e são veiculadas principalmente pela água contaminada e alimentos (CARNIEL, 2008; PERRY; FETHERSTON, 1997).

A *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são muito semelhantes geneticamente, apresentando mais de 95% de semelhança quanto às seqüências dos genes cromossômicos (LUCIER; BRUBAKER, 1992). Em decorrência das similaridades gênicas e intergênicas 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 às considerações de segurança no laboratório que devem ser adotadas na manipulação da *Y. pestis* (PERRY; FETHERSTON, 1997). 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 *et al.*, 1999, 2004).

Acredita-se que a transmissibilidade da *Y. pestis* pela picada de pulgas seja uma adaptação evolucionária recente que a distinguiu da *Y. pseudotuberculosis* e outras bactérias entéricas (HINNEBUSCH, 2005). As análises filogenéticas sugerem que a *Y. pestis* evoluiu da *Y. pseudotuberculosis* entre 1500 a 20000 anos atrás (STENSETH *et al.*, 2008).

Uma característica marcante das cepas de *Y. pestis* é sua homogeneidade fenotípica, apresentando apenas um sorotipo, um fagotipo e três biotipos ou biovars, assim definidos pela capacidade em fermentar o glicerol e reduzir nitratos a nitritos sendo cada um associado à uma das três pandemias de peste: *Antiqua* ou *Continental* (glicerol + e nitrato +), considerado causador da peste de Justiniano ou primeira pandemia, prevalente na Ásia Central, Sudeste da Rússia e África; *Medievalis* (glicerol + e nitrato -), acredita-se ser o causador da peste Negra, segunda pandemia, atualmente prevalente na região do Mar Cáspio;

Orientalis ou *Oceânico* (glicerol -, e nitrato +), causador da peste moderna, terceira pandemia e ainda circulante na Ásia e Hemisfério Ocidental. Eles não diferem quanto ao nível de patogenicidade, nem à forma clínica da doença (PERRY; FETHERSTON, 1997). Um quarto biovar, denominado *Microtus* (glicerol +, arabinose - e nitrato -), foi proposto para incluir cepas de *Y. pestis* que não utilizam a arabinose, diferentemente dos três biovars clássicos, além de ser considerada avirulenta para os humanos, apesar das epizootias de peste nos roedores na área de foco (ZHOU et al., 2004), Quadro 1. Recentemente foram identificadas cepas raminose positivas, sendo então proposto um quinto biovar, o *Intermedium*; este tem a marmota como principal hospedeiro, mas pode, ocasionalmente, infectar o homem (LI et al., 2009).

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

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

2.3 Animais reservatórios e transmissão da peste

A principal fonte de infecção por *Y. pestis*, na natureza, são os roedores; 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 da peste pertencem aos gêneros: *Necromys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Galea*, *Trychomys* e *Rattus*; alguns são mais resistentes a doença, como o *Galea* e *R. rattus*, enquanto outros, como os *Necromys*, são mais sensíveis, passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).

A ocorrência de uma epizootia com mortes de roedores, que abrigam pulgas em abundância, aumenta a chance de casos humanos. A alta incidência de casos está associada à pobreza, que resulta em habitações precárias e não resistentes a ratos (BUTLER, 2009).

As espécies de roedores mais resistentes à doença, ou seja, aqueles que, apesar de abrigar a bactéria, mostram pouco ou nenhum sintoma são particularmente importantes na manutenção dos focos naturais (LEAL-BALBINO et al., 2009).

Casos humanos de peste são, relativamente, espaçados nos focos naturais. Muitos desses casos isolados ocorrem entre pessoas que entraram em contato com roedores silvestres. A transmissão entre roedor - humano, geralmente, ocorre pela picada de pulgas infectadas. Formas pouco comum de transmissão ocorrem por contato direto ou manipulação de material infectado (KOIRALA, 2006). Os seres humanos são membros não integrantes na manutenção da peste na natureza, visto que a população de roedores e suas pulgas são suficientes para essa permanência, assim como os seres humanos são pobres transmissores de curtos surtos de peste pneumônica (BUTLER, 2009).

A epidemiologia da peste é bastante complexa e pode ser descrita por quatro ciclos bioecológicos (Figura 4). O ciclo enzoótico, que ocorre entre os hospedeiros naturais, moderadamente resistentes, envolve algumas espécies de roedores silvestres (ARAGÃO et al., 2009; STENSETH et al., 2008).

O ciclo epizootico inclui a transmissão do bacilo entre as espécies silvestres sensíveis. Essas espécies, frequentemente, morrem e suas pulgas procuram outros hospedeiros, como os roedores comensais (ARAGÃO et al., 2009; STENSETH et al., 2008).

No caso do ciclo domiciliar ou urbano, a ocorrência pode ser como consequência do ciclo epizootico. Neste, os homens e pequenos carnívoros, como cães e gatos domésticos, podem contrair a infecção por roedores silvestres infectados, ou através da picada de pulgas (ARAGÃO et al., 2009).

O ciclo pneumônico, caracterizado pela transmissão pessoa a pessoa, ocorre pela inalação de aerossóis produzidos nos casos de peste pneumônica (ANISIMOV; AMOAKO, 2006), por acidentes com tecidos ou materiais contaminados em trabalho de campo ou laboratório, como também em decorrência de possível utilização da bactéria como arma biológica (BRASIL, 2008; INGLESBY et al., 2000; STENSETH et al., 2008).

Animais como lagomorfos, marsupiais, insetívoros, carnívoros selvagens e domésticos, também podem contrair a infecção. As aves são refratárias, porém, podem carrear pulgas ou carcaças infectadas para outras localidades (STENSETH *et al.*, 2008) (Figura 4). Gatos domésticos se tornam infectados quando se alimentam de roedores, porém estes carnívoros desempenham um papel pouco significativo na epidemiologia da peste, provavelmente porque suas pulgas são transmissores ineficientes da infecção (BUTLER, 2009).

O principal mecanismo de transmissão da doença é através da picada de pulgas. 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 pode ocorrer também através da introdução das bactérias contidas na probóscide das pulgas (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).

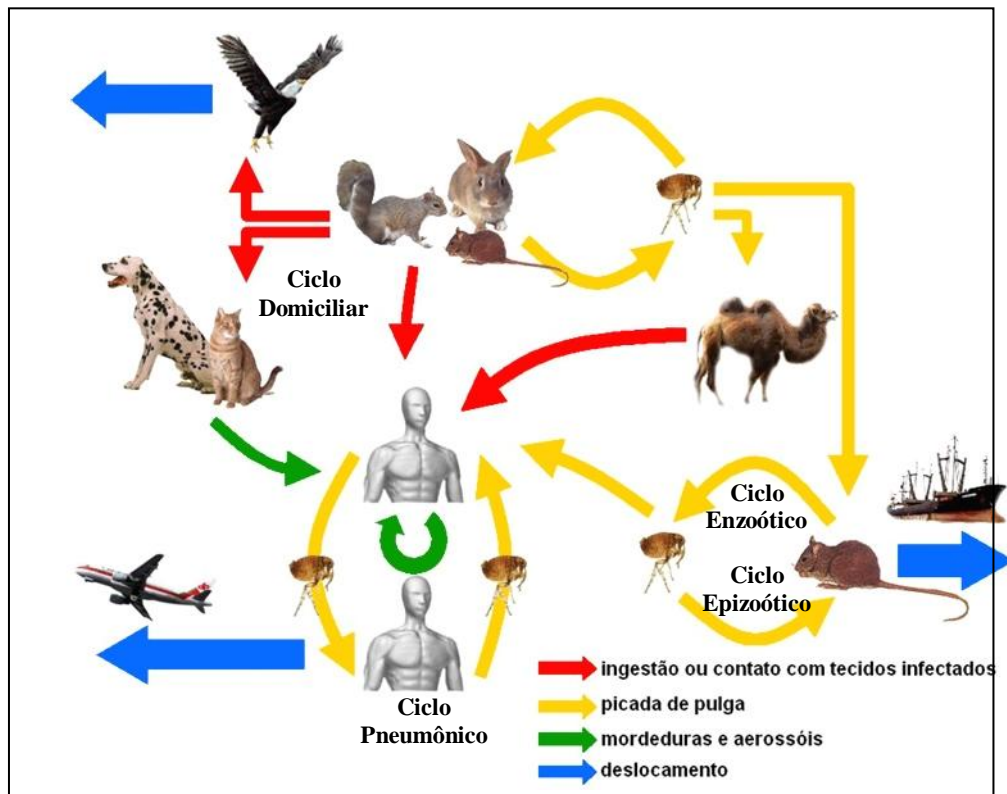


Figura 4. Ciclo epidemiológico da peste
Fonte: LEAL-BALBINO et al. (2009), com adaptações.

As pulgas são vetores reservatórios, pois podem transportar o bacilo no seu organismo por longo período e sobreviver nos roedores por vários meses. Como acontece com os roedores, cada região apresenta pulgas específicas do local. A *Xenopsylla cheopsis*, por ter sido bastante pesquisada desde o século passado e avaliada como mais suscetível do

que as outras pulgas, é considerada o vetor clássico da peste e serve de referência para análise da capacidade vetora de outras pulgas (BUTLER, 2009; POLLITZER, 1954) (Figura 5).

No Brasil, são encontradas 55 espécies de pulgas, onde as espécies *Polygenis bohlsi* e *P. tripus*, *X. cheopsis*, *Pulex irritans* e *Ctenocephalides felis* foram encontradas naturalmente infectadas pela *Y. pestis*. As espécies *Polygenis* têm uma especial capacidade em picar o homem, sendo considerado um sinal de alerta quando presente, denunciando a ocorrência de atividade pestosa (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).



Figura 5: *Xenopsylla cheopsis* ingurgitada com sangue.
Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2010)

Uma das características da peste são surtos periódicos em populações de roedores, alguns dos quais apresentam uma alta taxa de mortalidade. O risco para os seres humanos e outros animais, que circulam na área em que essa mortalidade acontece, aumenta porque pulgas infectadas que perderam seus hospedeiros naturais procuram outras fontes de alimento. Animais de estimação também podem carrear pulgas infectadas, facilitando o acometimento humano. A transmissão também pode acontecer, embora menos freqüentemente, através de uma ruptura na pele por contato direto com tecidos ou fluidos corporais de um animal infectado, por exemplo, na esfolia de um coelho ou outro animal (LEAL-BALBINO et al., 2009). Pelo mesmo motivo, um cuidado especial deve ser considerado por profissionais como veterinários e laboratoristas, a fim de não se contaminarem com tecidos de animais infectados através da pele, conjuntiva ocular ou mucosa orofaríngea (LEAL-BALBINO et al., 2009). O contato com conteúdo do bubão, na

peste bubônica, oferece risco de contaminação inter-humana (INGLESBY et. al., 2000; STENSETH et. al., 2008).

A peste é transmitida ainda, pela inalação de gotículas infectadas expelidas através da tosse ou espirro de uma pessoa ou animal, especialmente os gatos domésticos, com a peste pneumônica (LEAL-BALBINO et al., 2009).

A peste humana, em países endêmicos, apresenta uma variação sazonal. O período crítico corresponde ao tempo das epizootias com mortes de roedores suscetíveis. Estes períodos, muitas vezes, podem ser correlacionados com o aumento da fertilidade das pulgas, com o aumento da população de roedores e uma maior proximidade dos seres humanos com animais infectados (BUTLER, 2009).

2.4 Apresentações clínicas da doença

As formas bubônicas, septicêmica e pneumônica são as três apresentações clássicas da peste (Figura 6). O tipo mais comum é a peste bubônica, que ocorre, tipicamente, em dois a seis dias após a picada da pulga ou após a exposição direta da pele ou mucosas ao material infectado. No Nordeste do Brasil, esta forma clínica corresponde a 98% dos casos, caracterizando-se pela presença de um bubão extremamente doloroso (tumefação dos linfonodos) na região próxima da picada da pulga, acompanhada de febre alta (DENNIS et al., 1999; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999). Em casos não tratados, as complicações como septicemia secundária, pneumonia secundária e meningites são comuns. A taxa de casos fatais para peste bubônica é 60% em casos não tratados e menos que 5% com tratamento antimicrobiano apropriado (KOIRALA, 2006).

A peste septicêmica pode ser primária ou secundária. Peste septicêmica primária é caracterizada por uma elevada bacteremia, comumente, após exposição cutânea com ausência de linfadenopatia primária. A bacteremia pode resultar em outras complicações, como pneumonia ou meningite. Peste septicêmica secundária resulta da disseminação da bactéria após o estabelecimento de uma infecção localizada, como peste bubônica e/ou pneumônica. Clinicamente, a peste septicêmica assemelha-se às septicemias causadas por outras bactérias

Gram-negativas. A taxa de casos fatais em não tratados pode chegar a 100% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; KOIRALA, 2006).

A peste pneumônica primária resulta da inalação de partículas contendo *Y. pestis*, surgindo após um curto período de incubação (comumente de um a três dias). Esta forma clínica é considerada a mais fulminante e fatal, geralmente, resultando em morte dentro de 24 horas do início da doença (KOIRALA, 2006). O quadro infeccioso é grave e de evolução rápida, porém os sinais e sintomas pulmonares são discretos ou ausentes, só depois surgem dores no tórax, respiração curta e rápida, expectoração sanguinolenta, rica em bacilos pestosos. Se não tratada precocemente, surgem os sintomas de delírio e coma, podendo causar a morte (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005); a taxa de letalidade para esses casos pode chegar a 100% (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; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

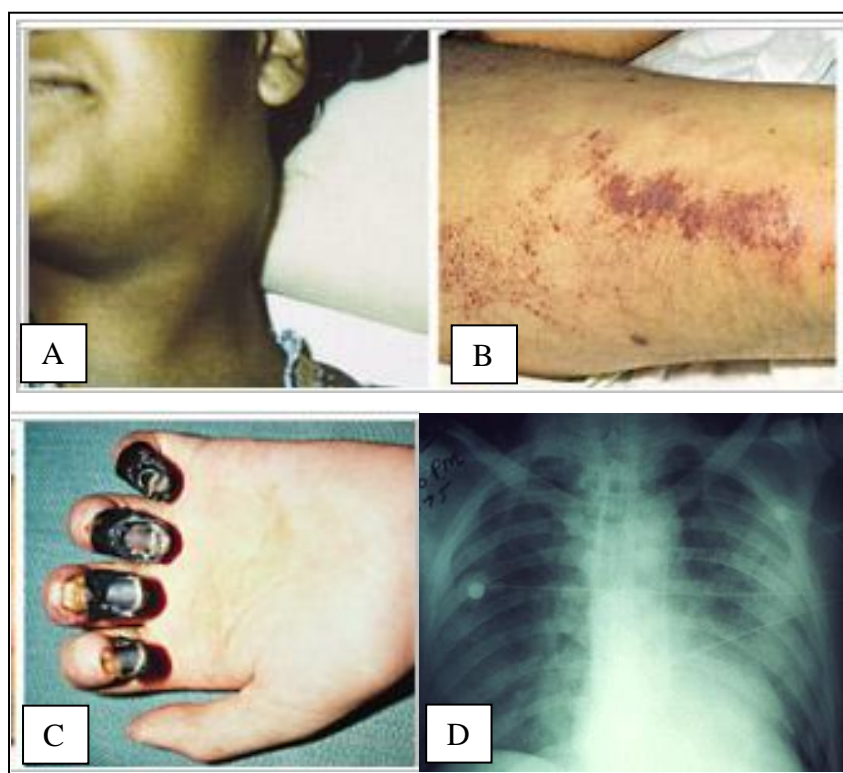


Figura 6: Formas clínicas da peste.

Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2010).

Legenda: A. Bulbo cervical em paciente com peste bubônica; B. Sangramento na pele de paciente com peste septicêmica; C. Gangrena dos dedos durante a fase de recuperação da doença; D. Radiografia de um paciente com peste pneumônica comprometendo os dois pulmões.

2.5 Diagnóstico laboratorial

Para realização do diagnóstico laboratorial de peste são utilizadas técnicas bacteriológicas: identificação e isolamento da bactéria; sorológicas: detecção de anticorpos antipestosos; e mais recentemente, moleculares: identificação de genes plasmidiais e/ou cromossomais da *Y. pestis* (CHU, 2000). A forma mais segura para a confirmação da infecção pestosa é o isolamento da bactéria, o que nem sempre é possível quando a amostra é procedente de casos humanos, por causa do retardamento no envio destas aos laboratórios responsáveis, o que acaba por inviabilizá-las. A punção do bubão é um procedimento cruento e doloroso, mesmo com a utilização de anestesia local, determinando, em alguns casos, o agravamento do quadro clínico (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).

2.5.1 Diagnóstico bacteriológico

Consiste no isolamento da bactéria, a partir do sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica do homem, macerado de pulgas ou ainda sangue e víceras de roedores (CHU, 2000).

2.5.1.1 Bacterioscopia

O diagnóstico bacteriológico por exame direto emprega as técnicas de coloração das amostras pelo azul de metileno (azul de Loffer), o corante de Wayson ou o método de Gram. A coloração pelo método de Gram permite observar os bacilos pestosos Gram-negativos nos esfregaços, entretanto, a coloração pelo azul de metileno ou pelo corante de Wayson é de execução mais simples e ressalta o aspecto bipolar do bacilo, o que favorece a identificação (BRASIL, 2008). Os bacilos de *Y. pestis* se apresentam alongados com extremidades coradas mais intensamente no formato de grânulos (CHU, 2000).

2.5.1.2 Cultura

Desde a descoberta do bacilo pestoso por Alexandre Yersin em Hong Kong em 1894, o isolamento do organismo pela cultura tem sido o método tradicional de diagnóstico de escolha. Também é considerado como referência padrão para diagnóstico de peste, porém métodos mais recentes foram desenvolvidos (KOIRALA, 2006).

Para identificação da *Y. pestis* as amostras biológicas são semeadas em duas placas contendo Agar sangue (Blood Agar Base = BAB, Difco), instilando-se, em seguida, uma gota do bacteriófago antipestoso específico em uma das placas e incubando a 28°C por 48 a 72 horas (BRASIL, 2008). As colônias apresentam tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante-translúcido e bordas inteiras. No ponto da cultura onde foi colocado o bacteriófago forma-se uma área de lise das colônias (KARIMI, 1978).

2.5.2 Diagnóstico sorológico

Quando existe um caso suspeito de peste e a *Y. pestis* não é isolada a partir das culturas, o diagnóstico sorológico pode ser útil. O CDC recomenda a detecção de anticorpos contra o antígeno F1 nos soros humanos ou de animais envolvidos no ciclo epidemiológico da peste pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI). Esta técnica é utilizada no diagnóstico dos casos humanos, no rastreamento da peste entre os roedores e em inquéritos sorológicos para delimitação dos focos. Em áreas onde não há evidência de peste recente, os carnívoros domésticos (cães e gatos) ou selvagens (marsupiais) podem ser testados sorologicamente como indicadores-sentinelas da presença ou da ausência da peste entre os roedores (BRASIL, 2008).

No momento em que as amostras não são viáveis para cultura, a utilização de exames sorológicos torna-se imperativa, mas apesar de ser usada em larga escala no diagnóstico da peste, a hemaglutinação apresenta vários inconvenientes: complexidade, reagentes perecíveis e baixa sensibilidade (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).

2.5.3 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares são uma alternativa para o diagnóstico da peste através da identificação dos genes de virulência. Vários ensaios de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que usam os genes estruturais do antígeno F1, do ativador plasminogênico e da toxina murina têm sido desenvolvidos e podem ser úteis como teste rápido e específico para diagnóstico da peste (BUTLER, 2009; KOIRALA, 2006). A PCR em tempo real com sondas para o RNA ribossomal 16S e para três fatores de virulência da *Y. pestis* foi altamente sensível e específica, com resultados em três horas (TOMASO, et al., 2003).

O Serviço Nacional de Referência em Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) tem desenvolvido diversos protocolos baseados na técnica de PCR e suas variações (Nested-PCR, Multiplex-PCR, Nested-PCRTbU) para o diagnóstico da peste em pulgas, material biológico de roedores ou humanos (LEAL et al., 1996; LEAL; ALMEIDA, 1999; 2003; SOUZA et al., 2007).

2.6 Tratamento, controle e prevenção da peste

A rapidez e a gravidade da evolução da peste exigem que o tratamento seja instituído o mais precocemente possível, visando a deter a bacteremia e a superar a toxemia (BRASIL, 2008). As drogas de eleição são a estreptomicina ou gentamicina, mas uma série de outros antibióticos também é eficaz. A estreptomicina deve ser administrada pela via intramuscular por 10 dias ou então até três dias após cessar a febre. Embora as sulfonamidas tenham sido amplamente utilizadas no tratamento da peste, quando comparadas a outros antibióticos, seu uso tem sido associado a uma mortalidade relativamente mais elevada, aumento de complicações e desaparecimento mais lento da febre (KOIRALA, 2006). Dependendo do grau e tempo de contato, a antibioticoterapia preventiva é sugerida aos que entram em contato com os pacientes com peste pneumônica (LEAL-BALBINO et al., 2009).

Também é recomendável, em situações de surtos de peste pneumônica em larga escala, o tratamento preventivo de todos os indivíduos que apresentarem temperatura igual ou superior a 38,5°C ou tosse; nesse caso, a via de administração recomendada é a oral, já que o

número de pessoas que necessitam do tratamento pode esgotar os recursos locais de saúde (KOIRALA, 2006).

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, pois o pronto tratamento é condição essencial para um bom prognóstico. A prescrição de antibióticos betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oxicefamicinas, carbapanemas e monobactâmicos), de macrolídeos (eritromicina, claritromicina, roxitromicina e miocamicina) e de azalídeos (azitromicina) na quimioprofilaxia ou no tratamento da peste está contraindicada. São ineficazes contra a *Y. pestis*, contrariando o antibiograma, e levarão o paciente à morte, pois ele evoluirá com meningite, pneumonia e septicemia (BRASIL, 2008).

A prevenção da transmissão da peste é um desafio porque a *Y. pestis* é um agente altamente infeccioso e pode ser transmitido por múltiplas vias. Sendo a peste uma zoonose é importante lembrar que a educação em saúde, visando o controle de roedores e pulgas em habitações humanas, pode ser útil na redução da transmissão aos seres humanos. Esta medida inclui saneamento ambiental para eliminar fontes de alimentos de roedores e a construção de casas à prova de ratos, além do uso de raticidas e inseticidas em torno de habitações humanas. Caçadores e visitantes de áreas reconhecidas como focos naturais da peste devem usar repelentes e evitar o contato com roedores e outros animais doentes ou mortos (DENNIS et al., 1999; GAGE; DENIS; TSAI, 1996; INGLESBY et al., 2000).

Pacientes com peste pneumônica primária ou secundária necessitam de isolamento respiratório e uso de máscara, além de ter que evitar o contato com indivíduos sadios (KOIRALA, 2006). 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 em algumas espécies de roedores resistentes à infecção (*Rattus rattus*). O controle dos focos de peste é realizado pela eliminação das pulgas com inseticidas apropriados bem como, desratização, antiratização e destruição de abrigos e alimentação para roedores, nas áreas de peste endêmica (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005).

A *Y. pestis* é muito sensível à luz solar e aquecimento, por isso não sobrevive muito tempo fora do hospedeiro; a descontaminação ambiental é feita com uma solução de hipoclorito a 0,5% ou uma diluição 1:10 de alvejante doméstico (INGLESBY et al., 2000).

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 peste 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. O fato de a antibioticoterapia ser eficaz contra a peste fez com que a vacinação em massa fosse descartada; porém, o isolamento de cepas resistentes e as constantes tensões e ameaças de uso da bactéria como arma biológica tem renovado o interesse no desenvolvimento de uma imunização contra peste (KOIRALA, 2006).

2.7 A peste como arma biológica

A peste tem sido usada como uma arma biológica desde o século XIV. O exército do tártaro (d.C. 1346) lançou cadáveres infectados sobre os muros da cidade inimiga, forçando os defensores genoveses a fugir, espalhando a doença para outras cidades e aldeias. O exército russo usou táticas similares no século XVIII, na guerra contra a Suécia. Durante a II Guerra Mundial, o exército japonês lançou grãos e pulgas nas áreas mais povoadas da China, o que resultou em pequenas epidemias em pelo menos três cidades. Os grãos eram supostamente para atrair ratos, o que iria ajudar na disseminação da doença (MCGOVERN; FRIEDLANDER, 1997).

Antes da Convenção de 1972, sobre a proibição de armas biológicas e toxinas, os Estados Unidos e a antiga União Soviética desenvolveram aerossóis de *Y. pestis*. A distribuição global junto com a facilidade de produção e disseminação em massa da *Y. pestis*, a torna uma arma biológica altamente potencial. A inalação de aerossóis contendo o bacilo pode resultar na peste pneumônica primária com uma alta taxa de mortalidade, tendo também um elevado potencial de propagação de pessoa para pessoa durante uma epidemia levando a um grande número de casos secundários. Os bacilos da peste podem permanecer viáveis no ar por até uma hora e serem deslocados por até 10Km pelo vento (INGLESBY et al., 2000).

Na ocorrência de um surto em um lugar que não é epidemiologicamente reconhecido como sendo enzoótico para peste, deve-se suspeitar de um ataque bioterrorista, assim como em situações em que pessoas que não apresentam fatores de risco (contato com roedores ou

pulgas, ou viagem recente a uma área enzoótica) sejam diagnosticadas como positivas (KOIRALA, 2006).

2.8 Aspectos genéticos da *Yersinia pestis*

A virulência da *Y. pestis* é plurifatorial; seus fatores de virulência são codificados no cromossomo de aproximadamente 4.650 kb e nos três plasmídios prototípicos: pPst ou pCP1 ($\pm 9,5$ Kb), pFra ou pMT1 (± 100 Kb) e pYV ou pCD1 (± 70 Kb) (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004) (Figura 7).

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). Uma cepa de *Y. pestis* com resistência aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da peste (cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, além dos antimicrobianos alternativos, como a ampicilina, canamicina, espectinomicina, neomicina e minociclina) foi isolada em Madagascar. Esta resistência foi atribuída à aquisição de um plasmídeo (pIP1202) contendo genes de resistência. Esta característica, por ser plasmidial, pode ser transmitida para outras cepas (GALIMAND et al., 1997; GUIYOULE et al., 2001).

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).

São encontrados no genoma da *Y. pestis*, um elevado número de elementos ou sequências de inserção (IS) capazes de participar de rearranjos cromossômicos causando inserções, deleções e recombinações (HUANG et al., 2002; MOTIN et al., 2002).

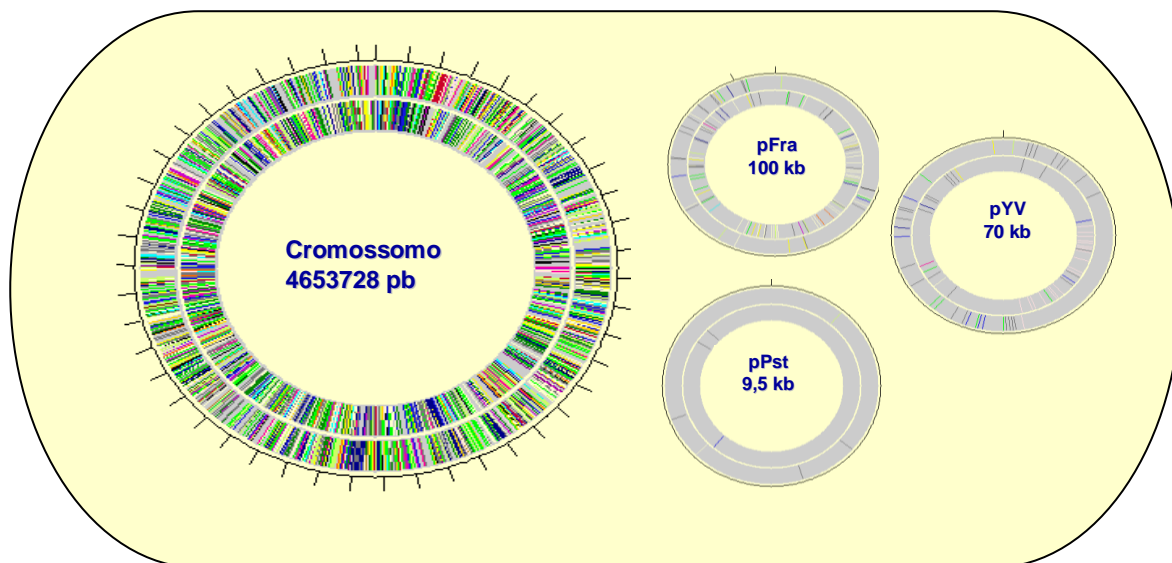


Figura 7. Esquema representativo do genoma da *Y. pestis*.
Fonte: Leal-Balbino (2006).

No genoma da *Y. pestis* também são identificadas sequências de DNA repetitivo, destacando-se os VNTRs e os locos CRISPR (KLEVYTSKA et al., 2001; LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005).

Os DNAs repetitivos podem ser classificados como: homopolimérico simples, constituído de um único tipo de nucleotídeo (poli A, poli G, poli C, poli T); ou ainda de classes multiméricas de repetições. Estas repetições são constituídas de unidades idênticas (repetições homogêneas), unidades mistas (repetições heterogêneas) ou unidades que diferenciam das idênticas em poucos nucleotídeos (repetições degenerativas) (VAN BELKUM et al., 1997).

Nakamura e colaboradores (1987) nomearam as regiões genômicas com repetições em tandem como Número Variável de Repetições em Tandem ou VNTR (Figura 8). Estas regiões podem ser variáveis quanto ao número de repetições, ao tamanho, a localização e complexidade (VAN BELKUM et al., 1997).

Quanto à localização, os VNTRs podem ser encontrados em tandem ou dispersos no genoma e, quanto ao tamanho, podem ser classificados como mini (repetições de mais de seis pares de bases) ou microssatélites (unidades repetidas que variam de um a cinco pares de base) (GRISSA et al., 2008; JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985).

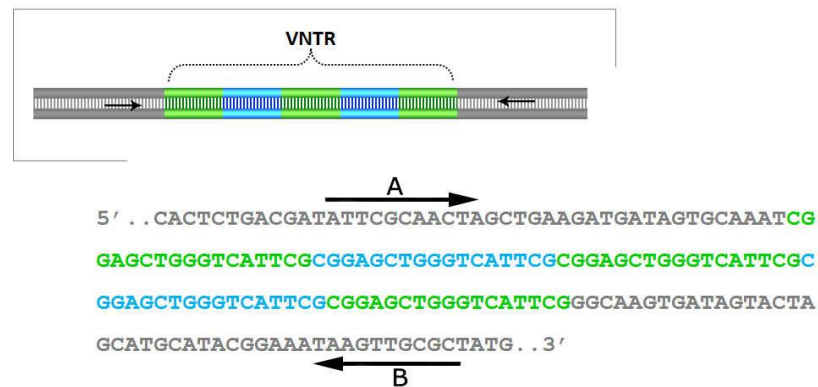


Figura 8. Representação esquemática de um loco VNTR.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Possui cinco unidades de repetição, composta por 17 pb (sequências verdes e azuis). As setas indicam sítio de ligação *forward* (A) e *reverse* (B).

Os elementos CRISPR são estruturas genômicas que formam uma família de repetições dispersas presentes na maioria das arqueobactérias e na metade das bactérias com genomas sequenciados (HORVATH et al., 2008; HORVATH et al., 2009; JANSEN et al., 2002; TANG et al., 2005). São, comumente, encontrados no cromossomo; embora, ocasionalmente, apareçam em plasmídios (HORVATH et al., 2009).

O CRISPR consiste de repetições curtas e diretas ou DRs (Repetições Diretas), altamente conservadas, de aproximadamente 28 a 48 pares de bases, podendo ser encontradas até 250 vezes no genoma. As sequências repetidas (DRs), geralmente específicas para um determinado loco, são inter espaçadas por sequências variáveis de tamanho constante e similar, chamadas de espaçadores (*spacers*). Dependendo do microrganismo ou loco CRISPR, os espaçadores podem variar de 20 a 58 pb (GRISSA et al., 2008).

Comparações entre os locos CRISPR de diferentes espécies mostraram que as DRs são idênticas em um determinado loco, salvo a existência de uma repetição degenerada (DG) localizada em uma das suas extremidades. À margem oposta a DG, observa-se a presença de uma região com alto conteúdo de Adenina-Timina (A/T), denominada de Sequência Líder, servindo como sítio promotor da transcrição (BROUNS et al., 2008; JANSEN et al., 2002; MANDIN et al., 2007; TANG et al., 2005) (Figura 9).

A estrutura CRISPR está, geralmente, localizada próximo aos genes *cas* (genes associados ao CRISPR), considerados como uma família gênica grande e polimórfica. Estes genes codificam proteínas que transportam domínios nucleotídicos, tais como nucleases, helicases e ligases (MAKAROVA et al., 2002). Foi sugerido, por Mojica e colaboradores (2000), que estas proteínas, também contribuem na incorporação de novos motivos (DR + espaçador) no loco CRISPR.

pequenos RNAs; e (iii) defesa contra o DNA exógeno por meio da ação do complexo CRISPR RNA e proteínas Cas (crRNA/Cas) (OOST et al., 2009).

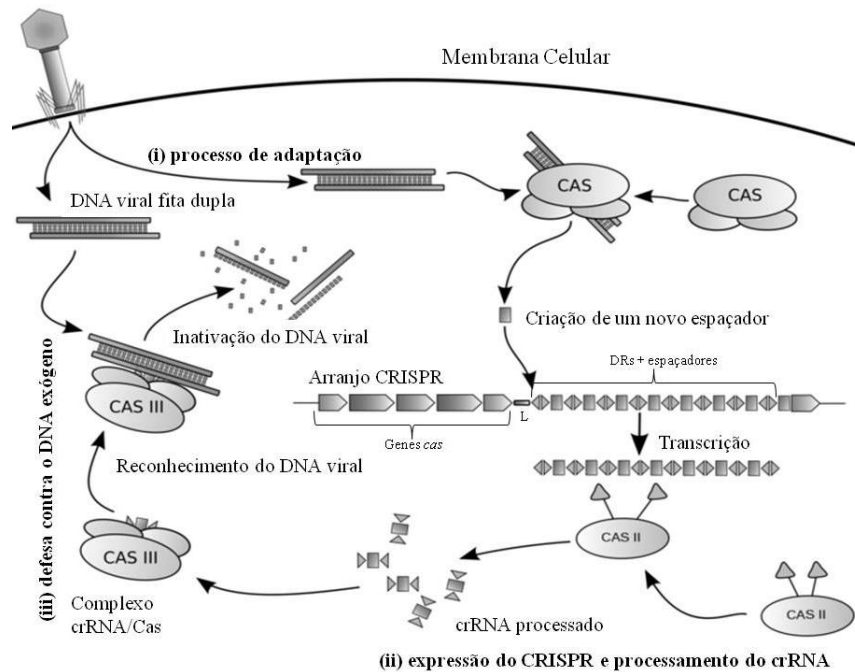


Figura 10. Esquema do mecanismo de defesa baseado no complexo CRISPR/Cas.

Fonte: Adaptado de Oost et al. (2009).

Legenda: (i) processo de adaptação após a invasão do DNA exógeno; (ii) expressão do CRISPR e processamento do crRNA para inativar o DNA invasor; (iii) defesa contra o DNA exógeno através do reconhecimento do DNA pelo complexo crRNA/Cas. DRs representados em triângulos e espaçadores em retângulos. L: sequência Líder.

A diferenciação entre sequências exógenas e sequências do próprio organismo foi observada em análise CRISPR realizada em *Staphylococcus epidermidis*. Este sistema utiliza o pareamento dos crRNAs não só para especificar um alvo, mas também para preservar uma reação auto-imune. Diferenças no pareamento são importantes para discriminar as sequências próprias ou exógenas (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010). A figura 11 mostra as diferenças na complementariedade do crRNA e sequência-alvo.

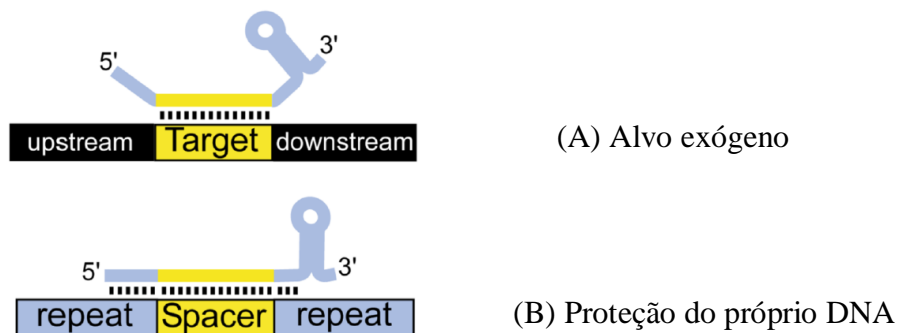


Figura 11. Modelo geral de prevenção auto-imune do sistema CRISPR.

Fonte: Marraffini; Sontheimer (2010).

Legenda: (A): reconhecimento apenas das sequências espaçadoras. (B): reconhecimento da sequência espaçadora e porção final das DRs.

Apesar do empenho de vários grupos de pesquisas no estudo dos CRISPR, a origem das sequências DRs e os mecanismos de transferência da informação genética dos fagos ou plasmídios para esses locos, em forma de novos espaçadores, permanecem desconhecidas (KARGINOV; HANNON 2010).

No genoma da *Y. pestis* existem três locos CRISPR, denominados YPa, YPb e YPc por Cui e outros (2008) ou YP1, YP2 e YP3 por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005), localizados sempre no cromossomo, porém sem localização física específica (Figura 12).

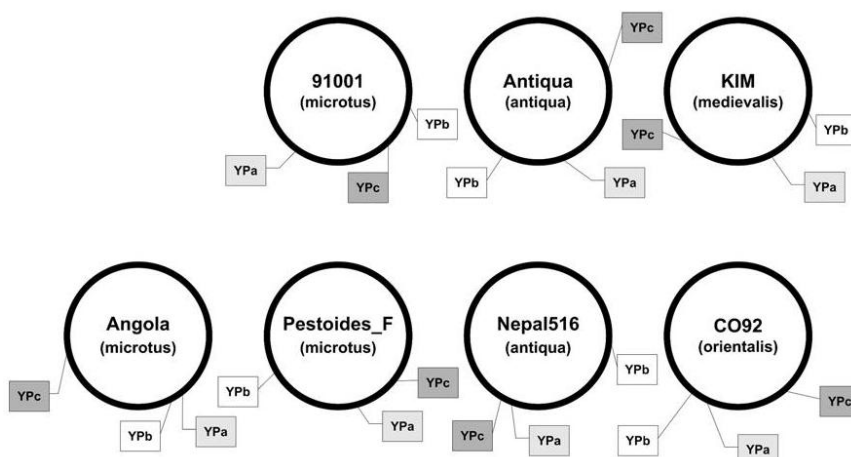


Figura 12. Representação esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no genoma da *Y. pestis*.
Fonte: Cui et al (2008).

Diante da plasticidade do genoma da *Y. pestis*, estabelecer um marcador molecular capaz de mostrar diferenças entre cepas provenientes de diversos focos, disseminados em numerosos países, é de fundamental importância, visto que tornaria possível detectar a

introdução de uma nova cepa em um foco ou um país a partir de outros focos ou na eventualidade de atividade bioterrorista.

2.9 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular usa técnicas de biologia molecular no estudo dos determinantes da ocorrência da doença e de sua distribuição. As técnicas moleculares estão integradas na prática da epidemiologia de doenças infecciosas para caracterizar de forma precisa as amostras de organismo e não substituem os métodos convencionais, são direcionados a questões que não são resolvidas ou então que seriam mais trabalhosas e caras, e mais demoradas de serem solucionadas se fossem utilizadas técnicas convencionais (FOXMAN; RILEY, 2001).

2.9.1 Ferramentas moleculares para estudos epidemiológicos

As restrições dos métodos fenotípicos levaram ao desenvolvimento de métodos moleculares baseados no genótipo microbiano ou seqüência de DNA, que minimizem os problemas de diferenciação e reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de grandes bancos de dados do organismo caracterizado (OLIVE; BEAN, 1999).

Determinar o poder discriminatório de um método de tipagem é importante, devido a alguns métodos agruparem organismos dentro de poucos grupos, enquanto outros dividem as coleções dos isolados relacionados epidemiologicamente. Diante disso, existe uma necessidade de se estabelecer um método apropriado para diferenciar os isolados bacterianos dentro da população estudada e correlacionar com as informações epidemiológicas (TENOVER et al., 1995).

Atualmente, diferentes técnicas moleculares têm sido descritas e aprimoradas para identificação e comparação de isolados bacterianos; dentre elas as baseadas em PCR como, por exemplo, o RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente), PCR-Ribotipagem, RFLP-IS (Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição-

Sequências de Inserção), MLVA (Análise do Número Variável de Repetições em Tandem), análise dos locos CRISPR, além de outras técnicas: PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) (BARROS, 2007; CUI et al., 2008; HUANG et al., 2002; LEAL, 1998; MORELLI et al., 2010; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2002; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005; SOBREIRA, 2002; TOUCHMAN et al., 2007).

2.9.1.1 RAPD

O uso de marcadores RAPD na análise genética teve uma difusão extremamente rápida. Embora não necessite de conhecimento prévio da seqüência da bactéria e identifique o perfil do genoma de forma geral, incluindo seqüências plasmidiais, a técnica é de difícil reprodutibilidade, sofrendo interferência da qualidade e quantidade do DNA, variação do modelo do termociclador, da marca e até do lote da enzima utilizada nas reações (LEAL et al., 2004). Entretanto, quando aplicado em cepas de *Y. pestis* brasileiras, a técnica RAPD revelou um padrão homogêneo para as cepas com diferentes características epidemiológicas (LEAL, 1998).

2.9.1.2 PCR-ribotipagem

A PCR-ribotipagem é baseada na amplificação da região espaçadora intergênica dos genes ribossomais que codificam o rRNA 16S e 23S (de 2 a 14 cópias) (KOSTMAN et al., 1992). Trata-se de uma ferramenta pouco informativa, pois analisa uma pequena parte do genoma correspondente aos locos ribossomais (GRIMONT; GRIMONT, 1986). Quando aplicada a estudos com cepas de *Y. pestis* do Brasil, a técnica demonstrou um padrão idêntico para cepas de diferentes focos e fontes de isolamento (SOBREIRA, 2002).

2.9.1.3. RFLP-IS

A técnica que estuda o polimorfismo de fragmentos a partir das seqüências de inserções (IS's), baseia-se na capacidade desses pequenos segmentos de DNA bacterianos se inserirem em múltiplos sítios de uma molécula alvo, determinando rearranjos cromossômicos que resultam em inserções, deleções e recombinações (HUANG et al., 2002; MOTIN et al., 2002). A análise das ISs mostra-se eficaz na caracterização de diferentes espécies (BAQUAR et al., 1994; BIK; GOUW; MOOI, 1996; MOTIN et al., 2002). Sua aplicação em cepas brasileiras de *Y. pestis*, revelou-se promissora para a tipagem e estudos sobre a distribuição geográfica das cepas, porém são necessários estudos mais aprofundados com estas seqüências ISs (Silva, 2004).

2.9.1.4. PFGE

O PFGE tornou-se uma das técnicas muito utilizada para a caracterização de diversos microrganismos, incluindo os membros da família Enterobacteriaceae, Enterococcus spp, *Pseudomonas aeruginosa*, Candida spp dentre outros (BOTES et al., 2003; COSTA et al., 2008; DAVIS et al., 2003; GRAMMENOUE et al., 2006; RODRIGUEZ-LAZARO et al., 2007; XIA et al., 2009).

A análise genômica do PFGE é caracterizada pela identificação de padrões gerados após a digestão do DNA cromossômico por endonucleases de corte raro, seguida pela separação dos fragmentos por eletroforese com alternância direcional do campo elétrico. Isso possibilita a separação de fragmentos com elevado peso molecular (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992).

Quando confrontado com informações epidemiológicas e outros métodos de tipagem, o PFGE demonstrou ser comparável ou superior a outras técnicas disponíveis (HUANG et al., 2002; OLIVE; BEAN, 1999). No entanto, estudos com *Y. pestis* ainda são restritos.

Apesar de ser uma das técnicas mais utilizadas para análise de bactérias patogênicas, o PFGE não fornece resultados fáceis de serem interpretados e depositados em bancos de dados (GRISSA et al., 2008). Após adaptação de um novo protocolo, baseado no descrito pelo CDC,

esta ferramenta de análise tornou-se mais simples e rápida, revelando-se promissora para tipagem de cepas brasileiras de *Y. pestis* (BARROS, 2007).

Quando aplicadas em análise genético-epidemiológica de cepas brasileiras de *Y. pestis*, o PFGE demonstrou resultados satisfatórios. No entanto, é necessário ampliar os estudos realizados até o momento, com a finalidade de enriquecer as características obtidas das diferentes amostras (BARROS, 2007), assim sendo, os trabalhos utilizando esta ferramenta ainda estão em andamento.

2.9.1.5. MLVA

A análise dos VNTRs (Número Variável de Repetições em Tandem) ou MLVA (Análise de Múltiplos Locos do número variável de repetições em tandem), através da técnica de PCR, está sendo utilizada como marcador molecular em estudos epidemiológicos para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas. Esta ferramenta molecular identifica polimorfismo no genoma de espécies bacterianas que são geneticamente homogêneas quando analisadas por outras técnicas moleculares (DE BENITO et al., 2004; LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004; VAN BELKUM et al., 1997;). Dentre as diferentes espécies bacterianas analisadas com o MLVA destacam-se: *Y. pestis* de focos de outros países (ADAIR et al., 2000; KLEVYSTSKA et al., 2001; LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004), *Y. enterocolitica* (DE BENITO et al., 2004), *Bacillus anthracis* (KEIM et al., 2000), *Haemophilus influenzae* (VAN BELKUM et al., 1997), *Enterococcus faecalis* (TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2004), *Mycoplasma genitalium* (RORING et al., 2002) e *Francisella tularensis* (FARLOW et al., 2001).

A análise dos VNTRs em cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstrou diversidade genética entre cepas de alguns focos estudados; no entanto, ainda são necessárias mais pesquisas dos outros focos do Brasil e a comparação com outras ferramentas moleculares para melhor relacionar os dados genéticos com as características epidemiológicas das diferentes amostras (OLIVEIRA, 2006). A análise das cepas de *Y. pestis* através do MLVA também encontra-se em andamento.

2.9.1.6. CRISPR

A análise das sequências CRISPR tem sido utilizada em genotipagem para algumas bactérias: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Campylobacter jejuni*, inclusive cepas de *Y. pestis* de focos de outros países (BRUDEY et al., 2006; FILLIOL et al., 2003; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005; PRICE, et al., 2007; ZINK et al., 2003).

Este sistema multiestrutural foi primeiramente encontrado em *Escherichia coli* e também em mais de 40% de outros genomas bacterianos. Os CRISPR estão presentes em arqueobactérias e bactérias, e em associação com genes envolvidos na recombinação e reparo de DNA (JANSEN et al., 2002). No genoma da *Y. pestis*, tais elementos são encontrados em três cópias; sendo pelo menos um, altamente polimórfico (POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005; CUI et al., 2008).

Em estudos filogenéticos e de tipagem molecular, os CRISPR são analisados através de uma PCR, que utiliza pares de *primers* dirigidos às regiões flangeadoras dos locos CRISPR. Além do sequenciamento dos segmentos amplificados. Sua análise baseia-se na identificação de polimorfismos nos fragmentos amplificados como resultado de eventos de adição e deleção dos motivos (DR + Espaçadores), em consequência da aquisição pelas bactérias do fenótipo de resistência contra materiais genéticos exógenos (GRISSA; VERGNAUD; POURCEL, 2007).

A tipagem realizada pelos locos CRISPR é baseada na hipervariabilidade; predição e modulação de resistência ao fago. O conteúdo e a variabilidade dos espaçadores CRISPR, mesmo em cepas intimamente relacionadas, promovem uma base genética para tipagem de cepas (BARRANGOU; HORVATH, 2009).

A análise dos locos CRISPR têm desempenhado um importante papel na investigação epidemiológica de principais patógenos humanos, por exemplo *Mycobacterium tuberculosis*. Um banco de dados contendo informação de 300 isolados foi criado (BRUDEY et al., 2006).

Portanto, o estudo dos locos CRISPR aplicado em estudos evolutivos e epidemiológicos das cepas brasileiras, pode ser capaz de fornecer dados importantes sobre a evolução e a disseminação da *Y. pestis* no país.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos constantes avanços científicos e tecnológicos, a peste ainda constitui um problema de Saúde Pública, persistindo em vários focos naturais. Seu potencial epidêmico não pode ser negligenciado e no Brasil, existem focos onde a doença é mantida como enzootia de roedores silvestres comensais, ocasionalmente atingindo o homem, podendo determinar sérias consequências médicas e sócio-econômicas ao país, o que a torna um problema atual e merecedor de atenção (ALMEIDA; TAVARES; LEAL-BALBINO, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

As cepas de *Yersinia pestis* são muito homogêneas, apresentando um sorotipo, um fagotipo e quatro biotipos. Tais características fenotípicas são insuficientes para rastrear a origem de uma cepa ou detectar o surgimento de novos clones. A caracterização de marcadores capazes de mostrar diferenças entre cepas provenientes de diversos focos e países é de grande interesse epidemiológico, pois auxiliará na detecção de reservatórios e fontes de infecção, e no monitoramento de sua dispersão dentro e entre as populações estudadas (TENOVER et al., 1995).

Técnicas padronizadas no Departamento de Microbiologia - CPqAM, que envolve a análise das sequências VNTR (análise do número variável de repetições em tandem - MLVA) e o PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado), têm mostrado diversidade genética, porém não foi suficiente para esclarecer a história da peste e a relação genético-epidemiológica das cepas brasileiras. Diante disto, faz-se necessário mais de um marcador molecular para estabelecer, de forma segura, a relação epidemiológica entre as cepas. Ferramentas adequadas para genotipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis*, possibilitarão o planejamento e implementação de medidas de controle nas áreas de foco, além do rastreamento de novos casos de peste que surgirem no Brasil.

Os dados obtidos a partir da análise dos locos CRISPR vêm sendo utilizados com sucesso para tipagem e estudos filogenéticos em diferentes gêneros bacterianos (FILLIOL et al., 2003; MOJICA et al., 2005; MOKROUSOV et al., 2007; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005; PRICE et al., 2007) e poderá contribuir no estudo epidemiológico de cepas brasileiras de *Y. pestis*, visto que estes locos se apresentam como marcadores genéticos altamente conservados e específicos e distribuídos em cópias no genoma.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A análise dos locos CRISPR permitirá caracterizar e estabelecer a relação genética - epidemiológica entre as cepas de *Yersinia pestis* estudadas?

5 HIPÓTESE

A análise dos locos CRISPR permite caracterizar as cepas de *Yersinia pestis* e estabelecer uma relação genética - epidemiológica entre os isolados estudados.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

Avaliar o potencial dos locos CRISPR para o uso em estudos epidemiológicos de *Yersinia pestis* isoladas nos três focos de Pernambuco.

6.2 Específicos

- a) analisar os locos CRISPR, a fim de melhor compreender a estrutura destas regiões nas cepas brasileiras de *Y. pestis*;
- b) Realizar tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* de diversas fontes, regiões geográficas (os três focos de peste do Estado de Pernambuco) e períodos epidemiológicos;
- c) Correlacionar os achados genotípicos com os dados epidemiológicos conhecidos das cepas de *Y. pestis* (fonte, hospedeiro, local e data de isolamento);
- d) Comparar os perfis genotípicos das cepas brasileiras de *Y. pestis* com os perfis das cepas de outros focos;
- e) Comparar os perfis genotípicos deste estudo realizado com os locos CRISPR e os perfis genotípicos obtidos pela técnica do MLVA realizado em estudo anterior com cepas de *Y. pestis*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Bactérias e condições de cultivo

Foram analisadas 51 cepas pertencentes à coleção de culturas de *Yersinia pestis* do Serviço Nacional de Referência em Peste (SRP) do Departamento de Microbiologia - CPqAM/Fiocruz. Das 51 cepas, 43 foram isoladas de 10 diferentes municípios (Araripina, Bodocó, Caruaru, Exu, Granito, Ipubi, São Caetano, São José do Belmonte, Tacaimbó e Triunfo, todos situados no Estado de Pernambuco), três focos de peste (Araripe, Borborema e Triunfo), três hospedeiros (humanos, roedores e pulgas) e diferentes anos de isolamento (1966 a 1980) (Quadro 2). Foram incluídas para comparação dos padrões genotípicos oito cepas de *Y. pestis* de focos de outros países (Quadro 3).

As culturas foram renovadas por repique em caldo BHI (*Brain Heart Infusion broth*, HIMEDIA) enriquecido com hemina (1 mL hemina 0.25% : 200 mL de BHI) e incubadas a 28°C por 48 horas. Em seguida, plaqueadas em meio BAB – Blood Agar Base (HIMEDIA) e incubadas a 28°C por 24 a 72 horas.

A confirmação da identificação e da pureza das cepas de *Y. pestis* foi realizada utilizando o bacteriófago específico antipestoso a partir das culturas em placa. De cada cultura, duas ou três colônias com morfologia característica de *Y. pestis* foram repicadas individualmente em caldo BHI e incubadas a 28°C por 18 a 24 horas. Uma alíquota de cada crescimento foi plaqueada e em local demarcado da placa instilou-se uma gota do fago. A sensibilidade ao fago é caracterizada por um halo de lise no local onde o fago foi instilado, visualizado após 18-24 horas de incubação (KARIMI, 1978).

Dados epidemiológicos					Fragmentos Sequenciados (pb)			Motivos (DR+Espaçadores)			Perfil Genotípico
Cepa	Fonte	Foco	Municípios – PE	Ano	YPa	YPb	YPc	YPa	YPb	YPc	
P. Exu 15	Humano	Araripe	Exu	1966	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 185	Humano	Borborema	Caruaru	1967	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 246	Humano	Araripe	Araripina	1968	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 276	Humano	Araripe	Bodocó	1968	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 292	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 312	Humano	Araripe	Exu	1969	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 363	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 365	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 373	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1970	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 384	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1970	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 430	Roedor (Os)	Araripe	Exu	1971	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 459	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1971	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 602	Roedor (N)	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 617	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 623	Roedor (Gs)	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 715	Humano	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 718	Roedor (N)	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 720	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1974	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 738	Humano	Araripe	Araripina	1975	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 769	Humano	Araripe	Ipubi	1975	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 771	Humano	Araripe	Araripina	1975	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 778	Humano	Araripe	Araripina	1975	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 781	Humano	Araripe	Granito	1975	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 788	Pulga (Pj)	Araripe	Araripina	1977	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 791	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 793	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 798	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 813	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1979	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 822	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1979	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 825	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaibó	1979	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 827	Pulga (Pj)	Borborema	São Caetano	1979	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 845	Humano	Araripe	Ipubi	1980	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
P. Exu 16	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1966	268 pb 47,8% GC	330 pb 48,2% GC	208 pb 45,7% GC	4DR + 1DG (a1-a3+a95)	5DR + 1DG (b1-b4+b51)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG2
P. Exu 17	Humano	Triunfo	Triunfo	1966	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 248	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 249	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 351	Humano	Triunfo	Triunfo	1969	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 674	Humano	Araripe	Exu	1974	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 832	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaibó	1979	150 pb 51,0% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	2DR + 1DG (a1+a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG3
P. Exu 334	Humano	Araripe	Exu	1969	570 pb 48,4% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	9DR + 1DG (a1-a8+a94)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG4
P. Exu 340	Humano	Araripe	Ipubi	1969	449 pb 48,6% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	7DR + 1DG (a1+a3-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG5
P. Exu 387	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	329 pb 47,1% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	5DR + 1DG (a1-a3+a7-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG6
P. Exu 787	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1976	569 pb 48,2% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	9DR + 1DG (a1-a8+a88)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG7

Quadro 2. Características das cepas de *Y. pestis* estudadas e perfis gerados neste estudo.

Legenda: Pulga (Pj): *Polygenes jordani*; Roedor: (N) – *Necromys*; (Os) – *Oryzomys subflavus*; (Gs) – *Galea spixi*

Dados epidemiológicos					Fragmentos sequenciados (pb)			Motivo (DR + espaçadores)			Perfil Genotípico
Cepas	Fonte	Foco	Biovar	Ano	YPa	YPb	YPc	YPa	YPb	YPc	
PB8	S/I	Birmânia	Medievalis	S/I	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
PBM5	S/I	Birmânia	Medievalis	S/I	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
EV76	Humano	Madagascar	Medievalis	1926	509 pb 48,3% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG1
PKOL	S/I	Curdistão	Medievalis	S/I	509 pb 48,3% GC	150 pb 53,7% GC	208 pb 45,7% GC	8DR + 1DG (a1-a8)	2DR + 1DG (b1+b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG8
ALEX	Humano	EUA	Medievalis	1995	569 pb 49,4% GC	331 pb 49,2% GC	208 pb 45,7% GC	9DR + 1DG (a1-a8+a96)	5DR + 1DG (b1-b5)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG9
KIM	Humano	Iran	Medievalis	S/I	268 pb 47,8% GC	270 pb 47,8% GC	208 pb 45,7% GC	4DR + 1DG (a1-a3+a97)	4DR + 1 DG (b1-b4)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG10
PKR 684	S/I	Iran	Medievalis	S/I	208 pb 46,6% GC	270 pb 47,8% GC	208 pb 45,7% GC	3DR + 1DG (a1-a3)	4DR + 1 DG (b1-b4)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG11
P.PERU	Humano	Peru	Medievalis	1995	-	390 pb 49,5% GC	208 pb 45,7% GC	-	6DR + 1DG (b1-b5+b52)	3DR + 1DG (c1-c3)	PG12

Quadro 3. Dados epidemiológicos das cepas de *Y. pestis* de focos de outros países e perfis gerados neste estudo

Legenda: S/I: Sem Informação

7.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das culturas, utilizado para as reações de PCR, foi extraído seguindo protocolos descritos em Souza et al. (2007) e Keim et al. (2000), sendo este último adaptado para *Y. pestis* no Departamento de Microbiologia (CPqAM): as colônias foram ressuspensas em 200 µL de TE 10:1 (Tris-Cl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e submetidas à fervura em banho-maria por 20 min. Após a fervura, resfriou-se o material à temperatura ambiente por 5-10 min e centrifugou-se a 4°C por 2-3 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a -20°C para as análises posteriores.

Todas as etapas que exigiam a manipulação da cepa ainda viva foram realizadas no laboratório NB3 com todos os cuidados e segurança que os procedimentos demandam.

7.3 Tipagem Molecular das cepas de *Yersinia pestis* pela análise dos locos CRISPR

7.3.1 Amplificação dos locos CRISPR nas cepas de *Yersinia pestis*

Para amplificação dos locos CRISPR das cepas de *Y. pestis* estudadas, três pares de *primers* (YPa, YPb e YPc), que anelam nas regiões flanqueadoras dos locos e descritos por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005), foram utilizados (Quadro 4).

Loco	Sequências dos <i>primers</i>	Localização no cromossomo da cepa CO92	
		Posição inicial	Posição final
YPa	L:5'-AATTTTGCTCCCCAAATAGCAT-3'	2769294	2794802
	R:5'-TTTTCCCCATTAGCGAAATAAGTA-3'		
YPb	L:5'-ATATCCTGCTTACCGAGGGT-3'	2895283	2895613
	R:5'-AATCAGCCACGCTCTGTCTA-3'		
YPc	L:5'-GCCAAGGGATTAGTGAGTTAA-3'	1773655	1773862
	R:5'-TTTACGCATTTTGCGCCATTG-3'		

Quadro 4. Descrição dos *primers* utilizados no estudo e localização na cepa controle CO92 de *Y. pestis*.

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 100 µl, visando o sequenciamento dos fragmentos obtidos: 4 uL da suspensão de DNA, 20 µM de cada *primer*, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris, 0.16 mM de dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ e 4 U de Taq DNA polimerase (*Promega*) ou de Platinum[®] Taq DNA polimerase (*Invitrogen*).

As amplificações foram realizadas em um termociclador (*Biometra*) programado com o ciclo descrito por Le Flèche et. al. (2001) (Taq DNA Polimerase) ou seguindo as orientações do fabricante (Platinum Taq DNA Polimerase), ambos adaptados para as cepas estudadas (Quadro 5). Em todas as reações foi incluído um controle negativo contendo apenas a mistura da reação sem adição de DNA como molde.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% e corados com 10µl de SyBR Safe (*Invitrogen*). As imagens geradas foram visualizadas e capturadas em transiluminador de luz ultravioleta pelo programa 1D Image Analysis v. 3.5 (*Digital Kodak Science*). Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR foram utilizados os marcadores de peso molecular 50pb e 100pb (DNA ladder).

Etapas da PCR	Temperatura			Tempo	
		*Taq DNA Polimerase	**Platinum Taq DNA Polimerase	*Taq DNA Polimerase	**Platinum Taq DNA Polimerase
Desnaturação	1 ^a	96°C	94°	5 minutos	30 segundos
	2 ^a	96°C	94°	20 segundos	30 segundos
Anelamento	3 ^a	60°C	55°	30 segundos	30 segundos
Extensão	4 ^a	72°C	72°	1 minuto	1 minuto
	5 ^a	65°C	72°	5 minutos	7 minutos
Manutenção	6 ^a	4°C	4°	Indeterminado	Indeterminado

Quadro 5. Condições para amplificação da PCR

Fonte: * Lé Fleche et al, 2001, adaptado para as cepas estudadas; ** Como orientado pelo fabricante, com adaptações para as cepas estudadas.

Nota: *O ciclo da 2^a para a 4^a temperatura ocorre 34 vezes; ** O ciclo da 2^a para a 4^a temperatura ocorre 35 vezes.

7.3.2 Purificação e sequenciamento dos locos CRISPR

Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados, com o objetivo de analisar, de forma pontual, a organização estrutural dos locos CRISPR. Estes fragmentos foram purificados com o Kit Purelink PCR Purification (*Invitrogen*, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos pares de *primers* usados para as reações de PCR, no sequenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (*Applied Biosystems*), utilizando o Bigdye Kit (*Applied Biosystems*).

7.3.3 Análise das sequências CRISPR

As amostras sequenciadas foram montadas utilizando o programa disponível do DNASTAR (DNASTAR, Inc): Seqman™ II.

As sequências montadas, de cada loco estudado, permitiram a identificação das características estruturais através do programa on-line CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>). O alinhamento múltiplo das Repetições Diretas (DRs) dos locos analisados foi realizado através do programa MEGA, versão 4.0 (TAMURA et al., 2007).

As similaridades com os espaçadores identificados foram pesquisadas no banco de dados do GeneBank utilizando o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) disponível pelo site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

O conteúdo de GC das sequências analisadas foi obtido pelo programa Gene Runner, versão 3.05, com o objetivo de observar a estabilidade genômica dos locos CRISPR e confirmar a origem viral dos espaçadores encontrados neste estudo.

Um dendrograma foi gerado com base no número de diferenças entre as cepas pelo método UPGMA criado no MEGA v. 5.04 (TAMURA et al., 2011).

7.3.4 Comparação dos resultados CRISPR x MLVA

Com o objetivo de determinar o método mais adequado de análise epidemiológica, foi realizado um estudo comparativo dos perfis genotípicos obtidos com as cepas de *Y. pestis* de focos do Nordeste do Brasil pelo CRISPR e a técnica do MLVA obtida em trabalho anterior.

7.3.5 Análise discriminatória

A associação entre as técnicas de tipagem tiveram seu índice discriminatório determinado através do Índice Hunter Gaster (HGI), descrito em 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:

$$D=1-[1/N(N-1)]\sum_j(n_j-1)$$

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

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho não apresentou implicações éticas uma vez que as cepas utilizadas para extração do DNA pertencem à coleção de *Yersinia spp.* do Serviço Nacional de Referência em Peste do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Tipagem molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis* através da análise dos locos CRISPR

A amplificação dos locos CRISPR foi observada e confirmada em todas as cepas estudadas (Figura 13).

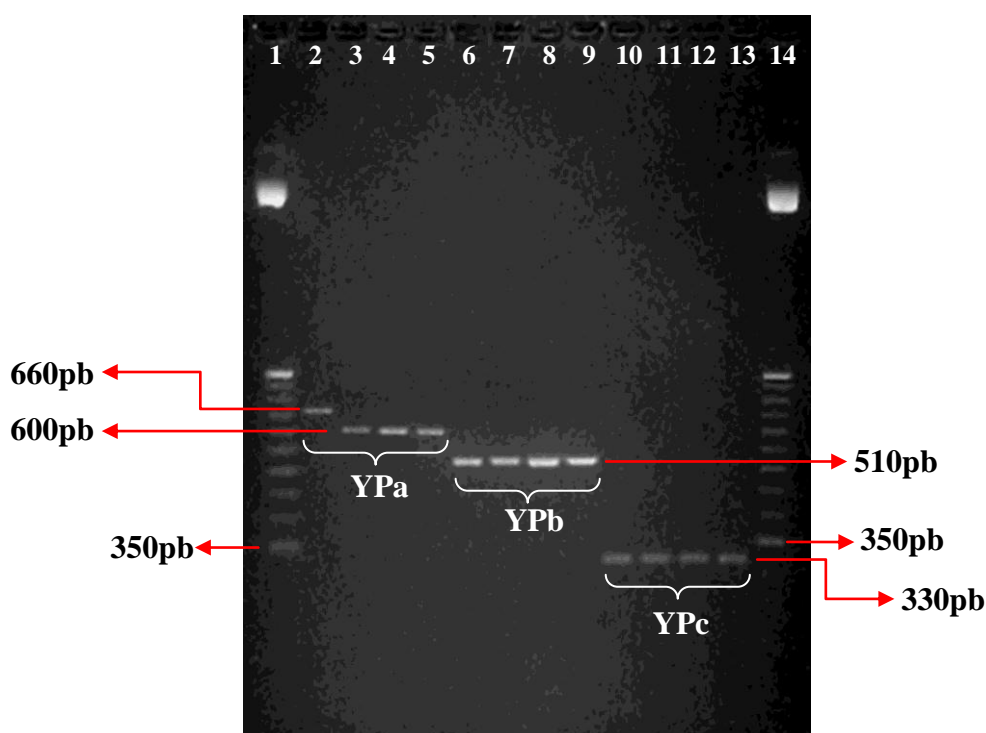


Figura 13. Gel representativo dos três locos CRISPR amplificados em cepas de *Yersinia pestis*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: 1 – Marcador DNA Ladder de 50pb; Ypa: 2 – P. Exu 769; 3 – P. Exu 771; 4 – P. Exu 778; 5 – P. Exu 781; Ypb: 6 – P. Exu 769; 7 – P. Exu 771; 8 – P. Exu 778; 9 – P. Exu 781; Ypc: 10 – P. Exu 769; 11 – P. Exu 771; 12 – P. Exu 778; 13 – P. Exu 781; 14 – Marcador DNA Ladder de 50pb.

Todos os locos apresentaram a mesma organização estrutural, com motivos constituídos por Repetições Diretas (DRs) de 28 pb, separados por sequências espaçadoras únicas e específicas de 32 ou 33 pb. A organização dos motivos (DR e Sequência Espaçadora) nas cepas estudadas foi comparada com a cepa padrão de *Y. pestis* CO92 como descrito por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005).

Foi possível observar que a maioria das cepas apresentou a mesma composição e o mesmo número de motivos quando comparadas com a cepa padrão. Algumas particularidades foram encontradas, como adição e deleção de alguns motivos (Figuras 14, 15 e 16). Tais características servem de alvos evolutivos para estudos filogenéticos (LILLESTOL et al., 2006; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Dois locos apresentaram polimorfismo: YPa e YPb, enquanto que o loco YPc mostrou-se monomórfico para as cepas estudadas (Quadro 2). Estes dados estão de acordo com o relatado por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005), os quais também identificaram apenas monomorfismo para o loco YPc, estudando isolados da Ásia e África.

O loco YPa corresponde ao marcador MLVA (ms06), anteriormente utilizado para estudos de tipagem em cepas de *Y. pestis* (LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004). A análise dessa região do genoma (VNTR-ms06) apresentou um elevado grau de polimorfismo, tanto em cepas brasileiras (OLIVEIRA, 2006), quanto em cepas de outros focos do mundo (LE FLÈCHE et al., 2001; POURCEL et al., 2004). Estes resultados apontam o loco YPa como um bom marcador para estudos de tipagem molecular em cepas de *Y. pestis*.

De acordo com Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005) e Lillestol et al. (2006), a evolução dos locos CRISPR pode ocorrer através de três eventos: supressões aleatórias de um ou mais motivos; adição; e duplicação, de forma polarizada, de novos motivos. Na análise de cepas brasileiras de *Y. pestis* foi possível observar dois desses mecanismos (supressão e adição de novos motivos) (Figuras 14-16; Quadro 2).

Sete alelos variando de 150 a 570 pb foram encontrados para o loco YPa (Figura 17; Quadro 2); foram observados dois alelos para o YPb: 330 e 331 pb (Figura 18; Quadro 2) e um alelo de 208 pb para o YPc (Figura 19; Quadro 2). Comparando o alelo mais frequente (509pb) no loco YPa, observou-se a perda de até seis motivos, resultando no alelo de 150pb nas cepas P.Exu17, P.Exu248, P.Exu249, P.Exu351, P.Exu674 e P.Exu832 (Quadro 2). Do mesmo modo, a perda de quatro motivos resultando no alelo de 268pb na cepa P.Exu16. E ainda a deleção de três motivos (329pb) na cepa P.Exu387 e um motivo (449pb) na cepa P.Exu340 (Quadro 2). A adição de apenas um motivo foi identificada nas cepas P.Exu787 e P.Exu334, resultando nos alelos de 569pb e 570pb, respectivamente. Fazendo a mesma comparação para o loco YPb, observamos que uma mesma cepa, a P.Exu16, perdeu um motivo e em seu lugar foi adicionado outro, resultando no alelo de 330pb, sendo esta a única cepa diferente das demais (Figura 20; Quadro 2).

Os dados obtidos estão de acordo com os relatados por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005) e Cui e outros (2008), onde as variações são decorrentes do acréscimo ou deleção de motivos na extremidade adjacente a Sequência Líder dos locos CRISPR.

Estudos sobre a diversidade, atividade e evolução do CRISPR realizados em *Streptococcus thermophilus* revelaram que a atividade CRISPR é definida pela capacidade do loco integrar novas unidades DRs+Espaçador, em resposta a exposição de um elemento genético estranho, tais como bacteriófago (HORVATH et al., 2008). Estes dados contribuem com resultados já apresentados por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005).

Diante das novas incorporações de motivos nos locos CRISPR YPa e YPb das cepas brasileiras de *Y. pestis*, podemos sugerir que estes encontram-se ativos. O loco YPc, tanto no presente estudo, como na literatura é definido como inativo, visto que não se observa alterações (incorporações ou deleções de motivos) na sua estrutura (Figura 20).

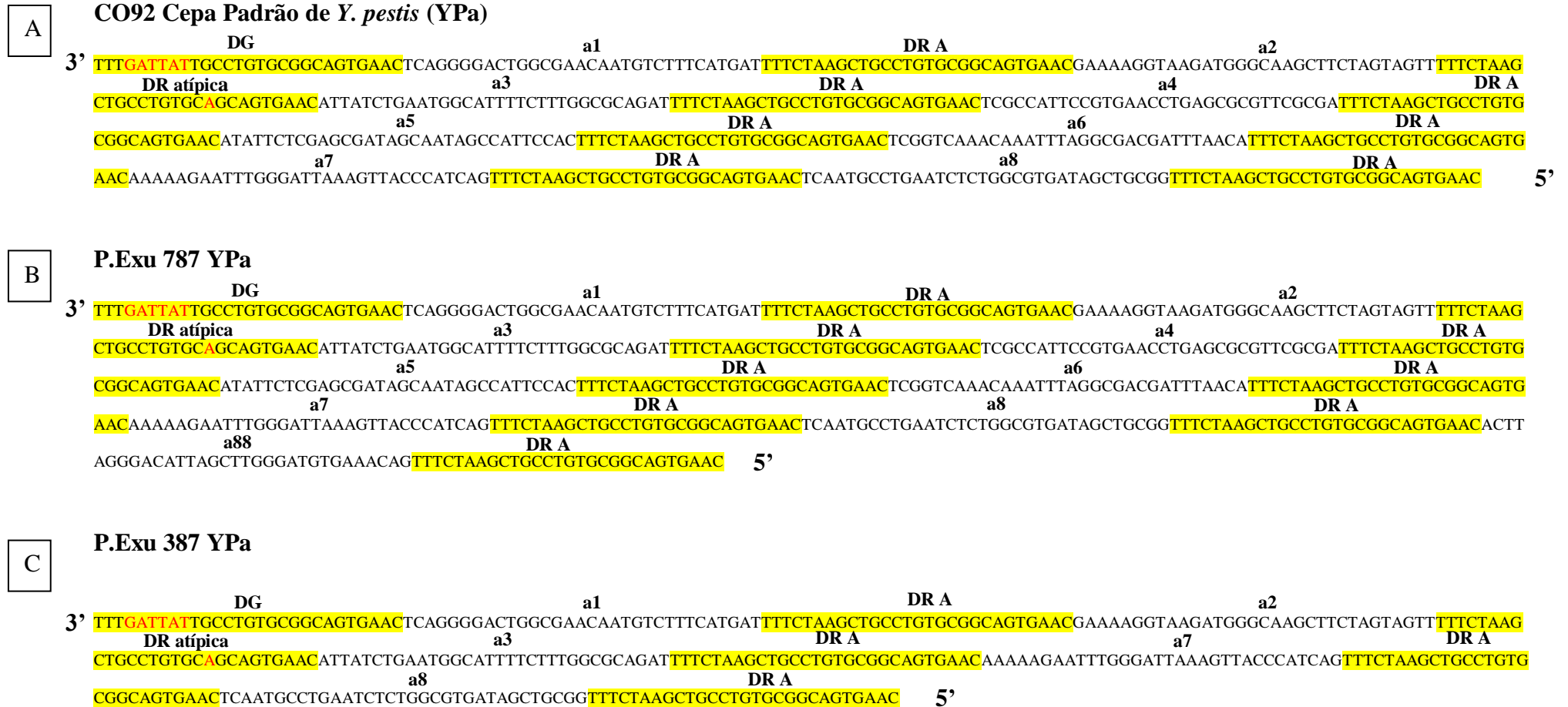


Figura 14. Representação das sequências nucleotídicas do loco YPa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Cepa padrão de *Y. pestis* CO92 (A). Exemplos de inserção (B) e deleção (C) de motivos nas cepas P.Exu 787 e P.Exu 387, respectivamente. DG: repetição degenerada, com seis nucleotídeos modificados; DR atípica: substituição nucleotídica de uma guanina por adenina; a1-a8: espaçadores padrões; a88: espaçador não descrito na literatura.

A CO92 Cepa padrão de *Y. pestis* (YPc)

3' ^{DG} **TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c1} GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c2} TTAAGTTCTTTTGTGTCAGCATCTTAATAAAT **TTTCTAAGC**
^{DR A} **TGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c3} CTGAAATACAAATAAAATAAATCGTCGAACAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

B P.Exu 276 YPc

3' ^{DG} **TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c1} GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c2} TTAAGTTCTTTTGTGTCAGCATCTTAATAAAT **TTTCTAAGC**
^{DR A} **TGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c3} CTGAAATACAAATAAAATAAATCGTCGAACAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

Figura 16. Representação das sequências nucleotídicas do loco YPc.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Cepa padrão de *Y. pestis* CO92 (A); cepa P.Exu 276 (B). DG: repetição degenerada, com cinco nucleotídeos modificados; c1-c3: espaçadores padrões.

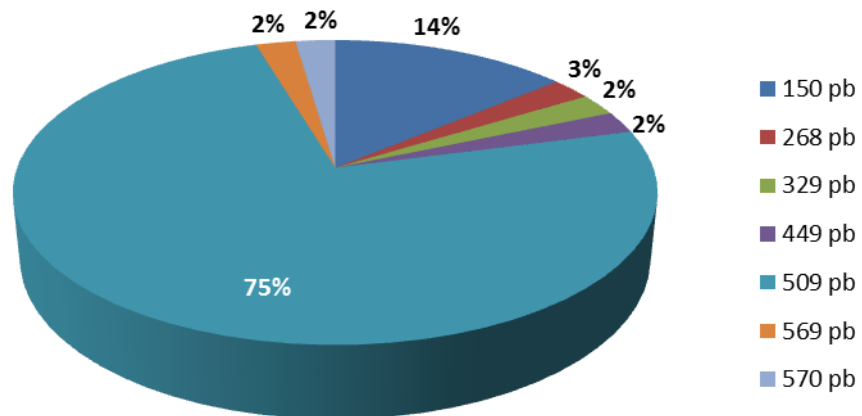


Figura 17. Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPa nas cepas de *Y. pestis*.

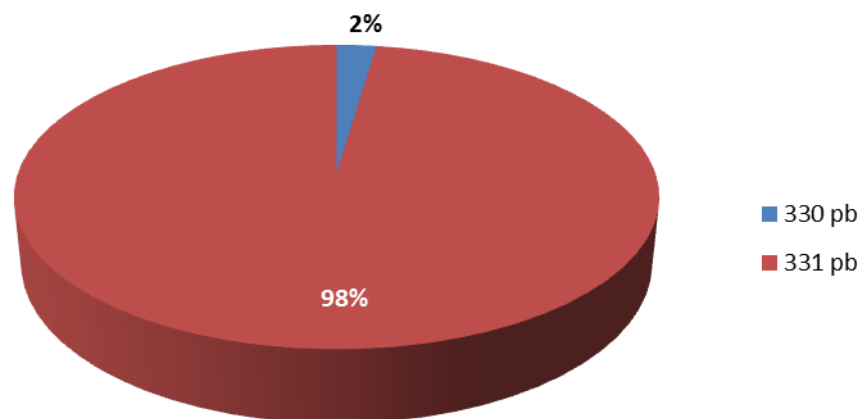


Figura 18. Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPb nas cepas de *Y. pestis*.

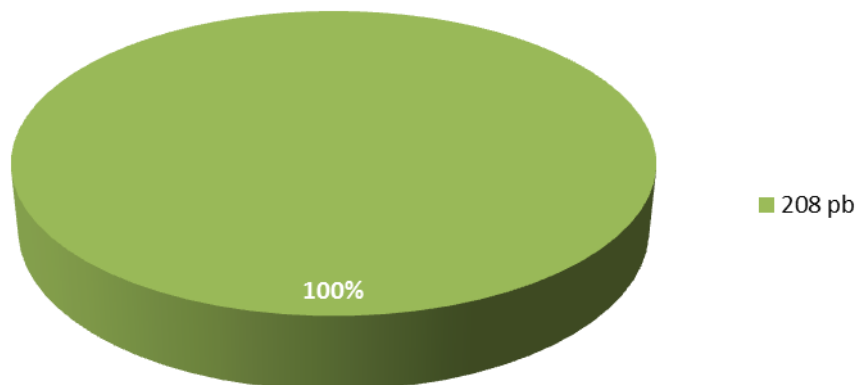


Figura 19. Representação gráfica da distribuição alélica do loco YPc nas cepas de *Y. pestis*.

a) Caracterização estrutural das Repetições Diretas (DR) nos locos CRISPR das cepas de *Yersinia pestis*

Os três locos CRISPR, identificados por sequenciamento nas cepas brasileiras de *Y. pestis*, foram definidos por sequências e tamanhos (28 pb) DRs idênticos, sugerindo que a conservação das sequências repetidas é importante para *Y. pestis* (CUI et al., 2008).

As sequências DRs dos três locos apresentaram dois tipos clássicos (A e degenerada) e uma repetição atípica, com uma variação pontual (Guanina – Adenina) em todas as cepas do loco YPa. As repetições degeneradas (DG) apresentaram nucleotídeos modificados próximo à extremidade 3' da sequência (Quadro 6; Figura 14-16).

CRISPR	Tipo	Sequências das repetições Diretas
YPa	Repetição A	3' TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'
	Repetição Atípica	3' TTTCTAAGCTGCCTGTGCAGCAGTGAAC 5'
	Repetição Degenerada	3' TTTGATTATGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'
YPb	Repetição A	3' TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'
	Repetição Degenerada	3' TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'
YPc	Repetição A	3' TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'
	Repetição Degenerada	3' TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC 5'

Quadro 6. Estrutura das sequências das Repetições Diretas (DRs) dos locos CRISPR.

As sequências degeneradas são observadas no final 3' da última repetição. Este dado é, particularmente, importante para a correta anotação e orientação dos locos CRISPR, visto que, novos motivos são inseridos na porção oposta das DGs. Esta orientação também está correlacionada com a orientação adjacente dos genes *cas* (HORVATH et al., 2008; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005).

As DGs diferem das DRs A de três a seis nucleotídeos próximos a extremidade inicial da sequência. Houve substituição de seis nucleotídeos no loco YPa, três no loco YPb e cinco no loco YPc (Quadro 6). Estes dados estão de acordo com os encontrados por Kunin, Sorec e Hugenholtz (2007), que sugerem que as alterações nucleotídicas representam mudanças compensatórias que preservam o pareamento entre os nucleotídeos complementares. A manutenção da complementariedade é importante, pois permite a formação da estrutura secundária do RNA responsável pelo reconhecimento da sequência extra-cromossômica proveniente de fago (KUNIN; SOREC; HUGENHOLTZ, 2007). Estudos já comprovaram que as DRs estão sujeitas a discretas variações, que podem afetar, levemente, a estabilidade de tais estruturas, porém não interferem na formação da estrutura secundária do RNA (HORVATH et al., 2008).

A comparação entre as sequências das DRs dos locos mostrou que o YPa e o YPb compartilharam 66 % de semelhança, enquanto YPa e YPc 43 %; e YPb e YPc 64,3 % dos seus nucleotídeos. Esta comparação revelou que, embora as DRs sejam altamente conservadas entre os três locos da *Y. pestis*, estas diferenças são devido as porções modificadas da DG de cada loco CRISPR, juntamente com as diferentes cópias representativas dos locos.

Diferentemente do que foi proposto por Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005), o grau de identidade das DRs revelou que a ancestralidade dos locos CRISPR parte do YPc, o qual se comporta como loco primitivo aos demais derivados. Diante da sua aparente inatividade, é possível sugerir que os locos CRISPR evoluíram a partir do YPc, seguido pelo YPb e YPa.

Variações no número de DRs por loco também foram observadas, como consequência da adição e/ou deleção de motivos. O loco YPa mostrou variabilidade: de duas a nove repetições, além da DG (Figura 20A). O loco YPb, por sua vez, não variou quanto ao número de DRs, embora não tenha mantido a mesma estrutura da *Y. pestis* CO92 para todas as cepas, porém a diferença observada foi no espaçador (Figura 20B); loco YPc apresentou a mesma estrutura da cepa padrão: apenas três repetições da DR, além da DG (Figura 20C).

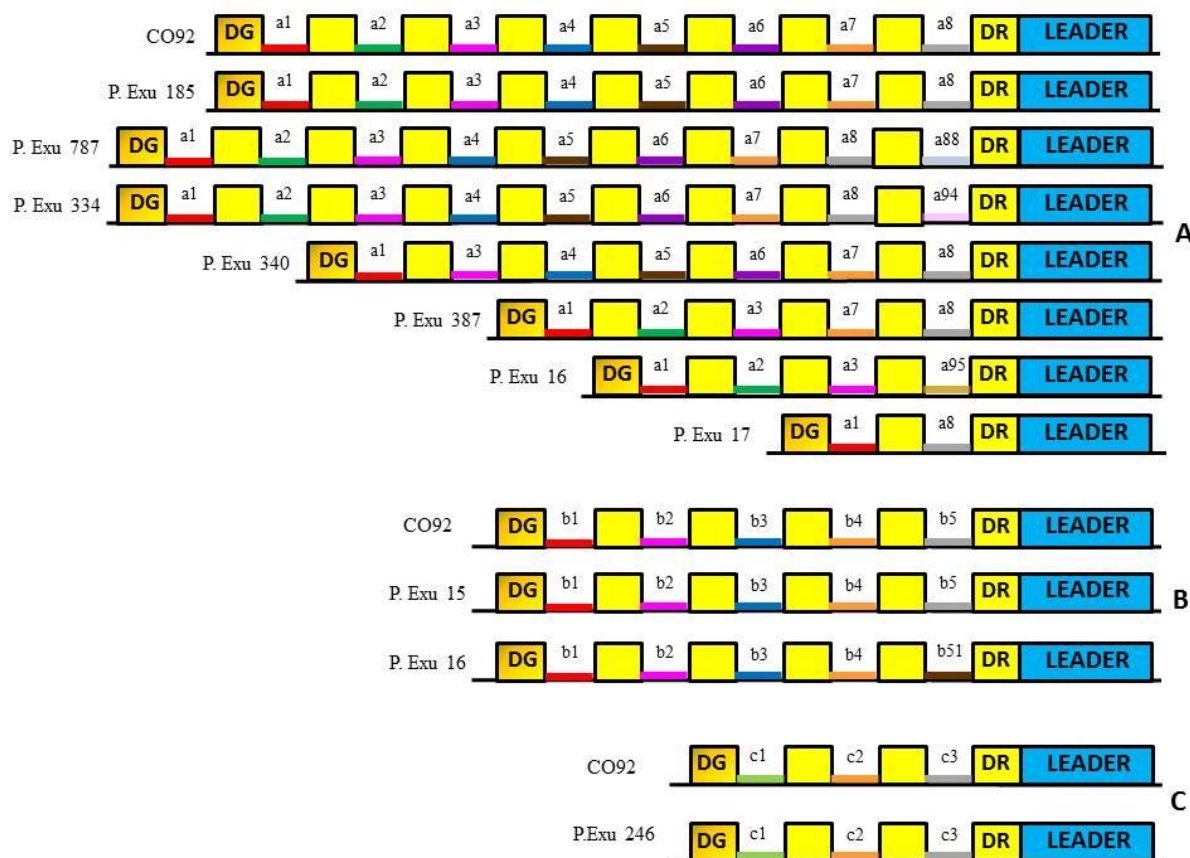


Figura 20. Representação esquemática da variação estrutural do loco YPa (A), YPb (B) e YPc (C) nas cepas brasileiras de *Y. pestis*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A sequência Líder está representada em azul, as Repetições Diretas (DR) em amarelo, a repetição degenerada (DG) em degradê e os espaçadores em diferentes cores. Loco da cepa CO92, depositada no GeneBank, usada como padrão da organização dos locos.

b) Caracterização das Sequências Espaçadoras CRISPR nas cepas de *Yersinia pestis*

A caracterização dos espaçadores foi realizada em todas as cepas. Um total de cinco cepas apresentou arranjos de espaçadores únicos e específicos para o loco YPa. Apenas uma cepa no loco YPb apresentou espaçador único e específico, já o loco YPc não apresentou diversidade entre as sequências espaçadoras (Quadro 2). Dos 131 espaçadores já publicados na literatura, 16 estavam presentes nas cepas analisadas. Das 43 cepas estudadas, apenas quatro apresentaram espaçadores ainda não descritos, sendo três para o loco YPa e um para o loco YPb. Houve uma distribuição de dois a nove espaçadores no loco YPa, cinco no YPb e no YPc apenas três espaçadores (Tabela 1; Figura 20).

Tabela 1. Distribuição dos espaçadores dos locos CRISPR.

	YPa	YPb	YPc
Número mais freqüente de espaçadores por loco (Espécie-Específico)	8	5	3
Número mínimo de espaçadores por loco	2	--	--
Número máximo de espaçadores por loco	9	--	--
Número de espaçadores inseridos não publicados	3	1	--
Número de espaçadores deletados	7	1	--

Segundo Pourcel, Salvignol e Vergnaud (2005) e confirmado por outras investigações (DEVEAU et al., 2007; LILLESTOL et al., 2006), os novos espaçadores são adquiridos em momentos recentes da exposição da bactéria a um material genômico exógeno. Estes espaçadores não são sintetizados *de novo*, na verdade são cópias de uma sequência de DNA existente, tais como fagos no genoma bacteriano (POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005).

Desta forma, espaçadores CRISPR fornecem uma perspectiva histórica da exposição da bactéria ao fago: espaçadores que se encontram na proximidade da Sequência Líder foram, recentemente, adicionados, enquanto os espaçadores mais distantes, provavelmente, originaram-se de eventos anteriores (HORVATH et al., 2008).

Conforme observado em estudos com isolados de *Y. pestis* de diferentes focos (CUI et al., 2008; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005), os locos CRISPR da maioria das cepas brasileiras analisadas também conservaram as primeiras organizações espaçadores Espécie-Específicos (SSSs), representados por “a1a2a3a4a5a6a7a8” para o loco YPa, “b1b2b3b4b5” para o loco YPb e “c1c2c3” para o loco YPc (Quadro 7; Figura 20).

Observou-se a perda de até seis espaçadores em nove cepas no loco YPa: P.Exu16 (a4-a8); P.Exu17, P.Exu248, P.Exu249, P.Exu351, P.Exu674 e P.Exu832 (a2-a7); P.Exu340 (a2); P.Exu387 (a4-a6). No loco YPb também observou-se perda de um espaçador na cepa P.Exu16 (b5) (Quadro 2). Essas perdas são provavelmente decorrentes de eventos de recombinação homóloga entre as DRs adjacentes (CUI et al., 2008; HORVATH et al., 2008). Acredita-se que estas deleções sejam estratégias, encontradas pela bactéria, de manutenção do tamanho do loco, sem prejuízo a sobrevivência da mesma (HORVATH et al., 2008).

Contrariamente a perda de espaçadores, incorporações próximas à região Líder foram identificadas ao loco YPa: P.Exu787 (a88); P.Exu334 (a94) e P.Exu16 (a95). No loco YPb apenas uma cepa (P.Exu16 – b51) incorporou novo espaçador (Tabela 2). Como já denominado em trabalhos anteriores (CUI et al., 2008; LILLESTOL et al., 2006; POURCEL;

SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005), os novos espaçadores localizados próximos a região Líder estão relacionados com uma região do foco de isolamento, sendo classificados como espaçadores Região-Específicos (RSSs). Dos três espaçadores específicos e únicos encontrados no loco YPa, dois (a88 e a94) pertenciam ao foco da Chapada do Araripe e um (a95) ao foco de Triunfo (Tabela 2). Apenas um espaçador específico e único (b51) foi encontrado no loco YPb e este pertencia ao foco de Triunfo. O loco YPc não apresentou espaçadores Região-Específico, sendo encontrado nos três focos estudados (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos espaçadores de acordo com focos de peste das cepas estudadas.

Espaçadores	Focos / Nº Cepas Isoladas		
	Araripe	Borborema	Triunfo
a1	28	4	11
a2	27	4	11
a3	28	4	11
a4	27	4	10
a5	27	4	10
a6	27	4	10
a7	28	4	10
a8	28	4	10
a88**	1	-	-
a94**	1	-	-
a95**	-	-	1
b1	28	4	11
b2	28	4	11
b3	28	4	11
b4	28	4	11
b5	28	4	11
b51**	-	-	1
c1	28	4	11
c2	28	4	11
c3	28	4	11

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: **Espaçadores não publicados na literatura; a= Loco YPa; b= Loco YPb; c= Loco YPc.

A partir dos novos espaçadores incorporados e dos demais encontrados nas cepas estudadas, foi possível estabelecer uma correlação geográfica aos dados genotípicos.

Os diferentes arranjos (deleções e inserções) dos espaçadores nos locos YPa e YPb permitiram a distribuição das 43 cepas brasileiras de *Y. pestis* estudadas nos sete perfis genotípicos (PG1-PG7) (Figura 21).

O perfil PG1 foi o mais frequente representado por 32 cepas, apresentando a estrutura CRISPR idêntica à estrutura da cepa padrão CO92. Este perfil genotípico foi encontrado em todos os focos de Pernambuco estudados (23 cepas - Araripe; 3- Borborema; 6-Triunfo). Em seguida o PG mais frequente foi o perfil PG3 representado por seis cepas de *Y. pestis*, também presente em todos os focos de peste estudados (1 cepa - Araripe; 1- Borborema; 4- Triunfo).

Estas cepas foram enquadradas em outro perfil genotípico devido a uma deleção de seis espaçadores (a2, a3, a4, a5, a6, a7) no loco YPa (Figura 21).

Os demais perfis foram específicos de uma determinada região de isolamento: PG2 foi o perfil representativo do foco de Triunfo, caracterizado pela deleção de cinco espaçadores (a4,a5,a6,a7,a8), uma inserção (a95) no loco YPa e uma deleção (b5) e inserção (b51) no loco YPb, foi a cepa mais atípica por ter sofrido um maior número de modificações genéticas e a única nos dois locos CRISPR.

Os perfis PG4, PG5, PG6 e PG7 são PG representativos do foco de Araripe e foram distribuídos por apenas uma cepa cada. Foram distribuídas em diferentes PG devido a inserções e deleções; PG4 sofreu uma inserção de um espaçador (a94), o PG5 uma deleção (a2), o PG6 três deleções (a4,a5,a6) e o PG7 uma inserção (a88), todas no loco YPa (Figura 21).

Os resultados obtidos fundamentam a aplicação da análise dos locos CRISPR em estudos epidemiológicos, já que foi possível identificar espaçadores Região-Específico (RSSs) para determinados focos de isolamento. Além de observar a dispersão da peste nos focos analisados (Figura 21 e 22).



Figura 21: Dendrograma de cepas de *Yersinia pestis*, sua origem e distribuição por Perfil Genotípico.
 Fonte: Elaborado pelo autor.
 Legenda: Pulga (Pj): *Polygenes Jordani*; Roedor: (N) *Necromys*; (Os)- *Oryzomys subflavus*; (Gs) *Galea spixi*

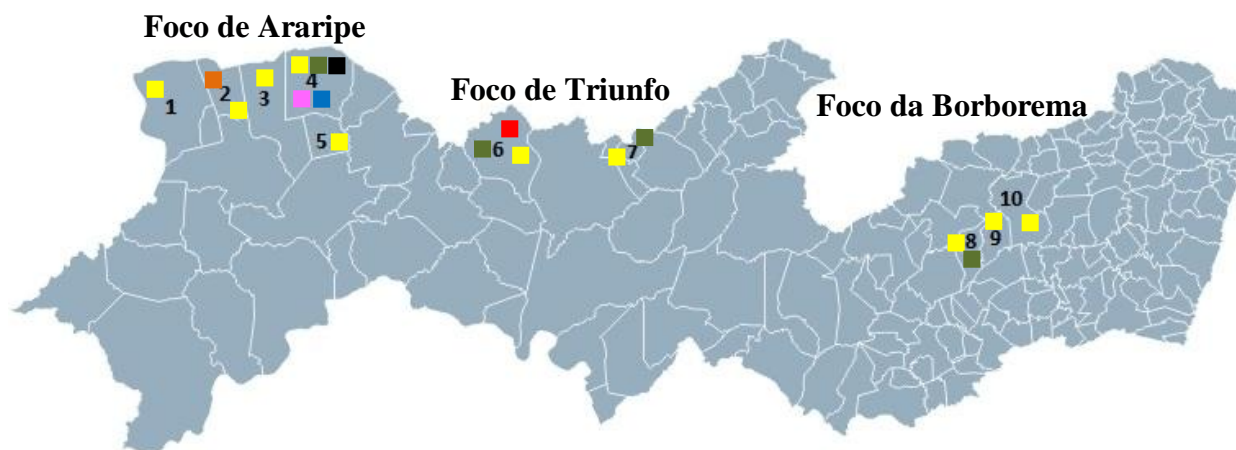


Figura 22. Distribuição geográfica dos perfis gerados pela análise dos espaçadores Região-Específico (RSSs) nos focos de peste estudados.

Legenda: Foco de Araripe: 1- Araripina; 2- Ipubi; 3- Bodocó; 4- Exu; 5- Granito;

Foco de Triunfo: 6- São José do Belmonte; 7- Triunfo;

Foco da Borborema: 8- Tacaimbó; 9- São Caetano; 10- Caruaru.

- **PG1** - P.Exu15; P.Exu246; P.Exu276; P.Exu312; P.Exu363; P.Exu365; P.Exu373; P.Exu384; P.Exu430; P.Exu459; P.Exu602; P.Exu617; P.Exu623; P.Exu715; P.Exu718; P.Exu720; P.Exu738; P.Exu769; P.Exu771; P.Exu778; P.Exu781; P.Exu788; P.Exu845 ; P.Exu185; P.Exu825; P.Exu827 ; P.Exu292; P.Exu791; P.Exu793; P.Exu798; P.Exu813; P.Exu822.
- **PG2** - P.Exu16.
- **PG3** - P.Exu17; P.Exu248; P.Exu249; P.Exu351; P.Exu674; P.Exu832.
- **PG4** - P.Exu334.
- **PG5** - P.Exu340.
- **PG6** - P.Exu387.
- **PG7** - P.Exu787.

Os espaçadores encontrados nas cepas foram investigados quanto à similaridade com sequências de fago, plasmídios e outras regiões genômicas (Quadro 7). Um total de 20 sequências espaçadoras foi analisado, incluindo três espaçadores únicos e específicos do loco YPa e um do loco YPb nas cepas brasileiras de *Y. pestis*.

Dos quatro espaçadores, ainda não publicados, três mostraram similaridade com sequências virais (fago) e um com sequências cromossômicas, que incluíam genes reguladores e transportadores. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores, os quais identificaram similaridade com sequências de fago ou plasmidiais e confirmam que os locos CRISPR estão envolvidos no mecanismo de defesa contra invasões genéticas exógenas (BARRONGOU et al., 2007; BOLOTIN et al., 2005; CUI et al., 2008; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005) já que as funções dessas proteínas são de nuclease, helicase e exonuclease.

Além disso, o pareamento da sequência espaçadora e uma pequena porção das DRs impedem uma reação auto-imune. Uma vez que, a bactéria reconhece seu próprio DNA. Diferentemente, do pareamento apenas da sequência espaçadora, que induz a resposta imune (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010).

Loco	Sinonímia*	Espaçador	Sinonímia*	Estrutura do Espaçador	Tamanho (pb)	Conteúdo GC (%)	Produto
YPa	YP1	a1	a	TCAGGGGACTGGCGAACAAATGTCTTTCATGAT	32 pb	46.9%	Proteína Hipotética
		a2	b	GAAAAGGTAAGATGGGCAAGCTTCTAGTAGTT	32 pb	40.6%	Proteína Hipotética
		a3	c	ATTATCTGAATGGCATTTCCTTTGGCGCAGAT	32 pb	37.5%	Proteína Hipotética
		a4	d	TCGCCATTCCGTGAACCTGAGCGCGTTCCGGA	32 pb	62.5%	Proteína Hipotética
		a5	e	ATATTCTCGAGCGATAGCAATAGCCATTCCAC	32 pb	43.8%	Proteína Hipotética
		a6	f	TCGGTCAAACAAATTTAGGCGACGATTAAACA	32 pb	37.5%	Proteína Hipotética
		a7	g	AAAAAGAATTTGGGATTTAAAGTTACCCATCAG	32 pb	31.2%	Proteína Fago
		a8	h	TCAATGCCTGAATCTCTGGCGTGATAGCTCGGG	33 pb	54.5%	Proteína Fago
		a88**		ACTTAGGGACATTAGCTTGGGATGTGAAACAG	32 pb	43.8%	Regulador Transcricional
		a94**	-	CTTGACCCTCAAATTGAGTGTAAGGGGTTTGG	33 pb	45.5%	Proteína do fago
		a95**	-	GCTCTGCGTCACTCTCATTGAGCACTTTAACC	32 pb	50.0%	Proteína do fago
		# a96**	-	TGCCTTTGCGCAGTCGCGCCACTTTCGG	32 pb	62.5%	Proteína do fago
# a97**	-	GCTCTGCGTCACTCTCATTGAGCACTTTAACC	32 pb	50.0%	Proteína do fago		
YPb	YP2	b1	a2	TCTGTACGCATACCGCCATCTTGCATCAGTCT	33 pb	50.0%	Proteína do Fago
		b2	b2	AGCAAAAATCTTAATTACATCTGATGATTTCGG	33 pb	30.3%	Proteína Hipotética
		b3	c2	TTTACGCGCAGCGCAAAGATTTCGGTCTTGTC	32 pb	50.0%	Proteína Hipotética
		b4	d2	TTCTGGATAGGACAAATAGGATGATTGTATCAG	33 pb	36.4%	Proteína Hipotética
		b5	e2	AACGAACCCACGTAGAATTGCCATCACCGCCGG	32 pb	57.6%	Proteína do fago
		b51	f2	GCATAACCGCCGAGGACGCTGTTAAATACTTT	32 pb	46.9%	Proteína do fago
		# b52**	-	GAGAATCGITTCAGGATAGTTTTCACCGCGT	31 pb	42.4%	Proteína Hipotética
YPc	YP3	c1	a3	GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC	32pb	59.4%	Proteína Hipotética
		c2	b3	TTAAGTTCCTTTTGTTCAGCATCTTTAATAAAT	32pb	21.9%	Proteína Hipotética
		c3	c3	CTGAAATACAAATAAAATAAATCGTCGAACAT	32pb	25.0%	Proteína Hipotética

Quadro 7. Estrutura e características dos espaçadores encontrados nos locos CRISPR das cepas de *Y. pestis* estudadas (brasileiras e de focos de outros países).

Nota: * Segundo Pourcel, Salviñon e Vergnaud (2005)

** Espaçadores não publicados na literatura

Espaçadores pertencentes às cepas de *Yersinia pestis* de outros focos

Embora, a maioria dos espaçadores CRISPR encontrados neste estudo tenha se mostrado similar com sequências de fago, também foi identificada similaridade com sequências cromossômicas e genes relacionados com a regulação e transporte protéico. Este achado pode indicar que o complexo CRISPR/Cas serve como sistema regulador microbiano envolvido no controle da transcrição mRNA para genes codificados no cromossomo (MOJICA et al., 2005; HORVATH et al., 2008).

Para reforçar a origem e a estabilidade dos espaçadores, o conteúdo GC das sequências foi verificado. Em média, 43,4 % da composição nucleotídica corresponde a Guanina e Citosina, cerca de 4,3 % menor que o conteúdo genômico (47,7%) da cepa CO92. Segundo Kunin, Sorec e Hugenholtz (2007), as sequências virais apresentam, em média, uma percentagem de GC até 7% menor que o conteúdo GC bacteriano.

O baixo percentual do conteúdo GC também reflete na instabilidade das sequências espaçadoras, tornando-as incapazes de formar a estrutura secundária do RNA (estrutura estável), importante na atividade de defesa da bactéria.

9.2 Tipagem molecular de cepas de *Yersinia pestis* de focos de outros países através da análise dos locos CRISPR

Os locos YPa e YPb apresentaram polimorfismo, enquanto que o loco YPc mostrou-se monomórfico. Quatro alelos variando de 208 a 569 pb foram encontrados para o loco YPa (Figura 23; Quadro 3); foram observados quatro alelos para o YPb, estes variaram de 150 a 390 pb (Figura 24) e um alelo de 208 pb para o YPc (Figura 25). Resultado semelhante foi encontrado nas cepas brasileiras de *Y. pestis*.

O alelo mais frequente no loco YPa foi o de 509 pb (PB8, PBM5, PKOL e EV76); comparando com o alelo mais frequente, houve a deleção de até cinco motivos resultando no alelo 208 pb (PKR684), resultados idênticos aos das análises com as cepas brasileiras. A cepa KIM também perdeu cinco motivos, porém outro evento genético (adição de um motivo) aconteceu resultando no alelo 268 pb. Ainda no loco YPa, outra cepa teve a adição de um novo motivo resultando no alelo de 569 pb: ALEX (Figura 26). No loco YPb o alelo mais frequente foi o de 331 pb (PB8, PBM5, ALEX e EV76) igualmente as cepas brasileiras. Houve deleção de até três motivos resultando no alelo 150 pb (PKOL); a deleção de um motivo foi observada resultando no alelo 270 pb nas cepas KIM e PKR684. Também se observou a adição de um motivo que resultou no alelo de 390 pb (P.Peru) no loco YPb (Figura 27). Não houve alterações na estrutura das cepas no loco YPc (Figura 28).

Assim como ocorreu com as cepas brasileiras estudadas, as cepas de *Y. pestis* de outros focos demonstraram ter os locos YPa e YPb ativos, enquanto o YPc encontra-se inativo.

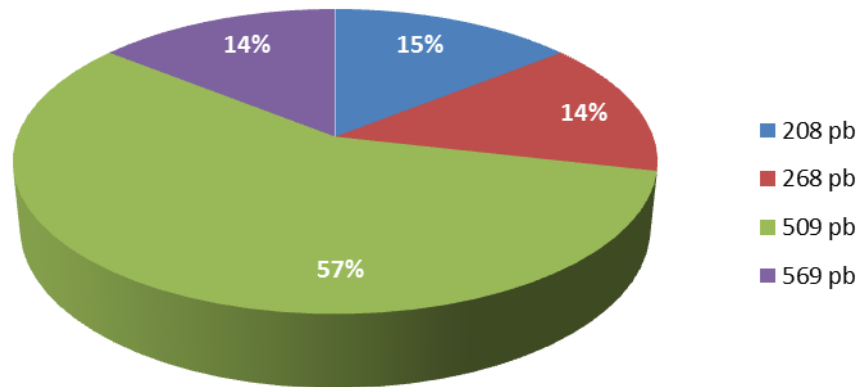


Figura 23. Distribuição alélica no loco YPa das cepas de *Y. pestis* de focos de outros países.

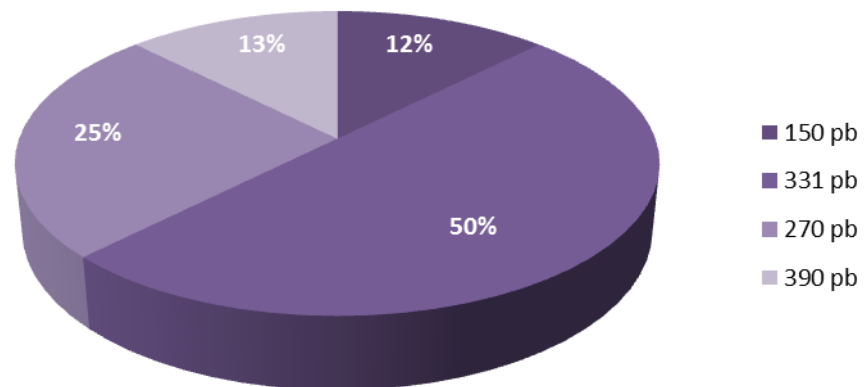


Figura 24. Distribuição alélica no loco YPb das cepas de *Y. pestis* de focos de outros países.

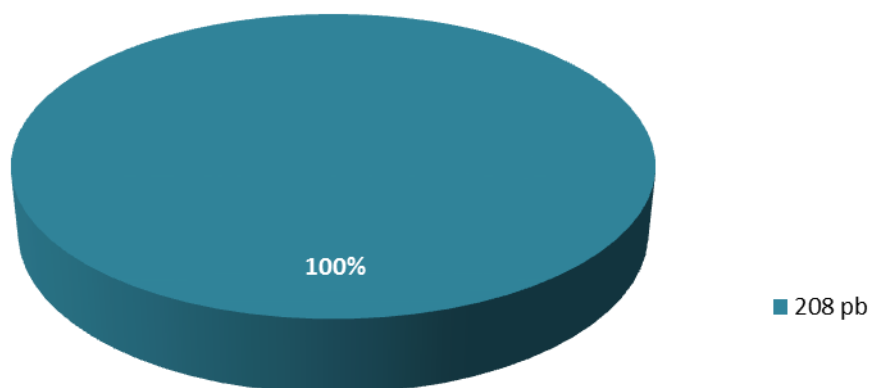


Figura 25. Distribuição alélica no loco YPc das cepas de *Y. pestis* de focos de outros países.

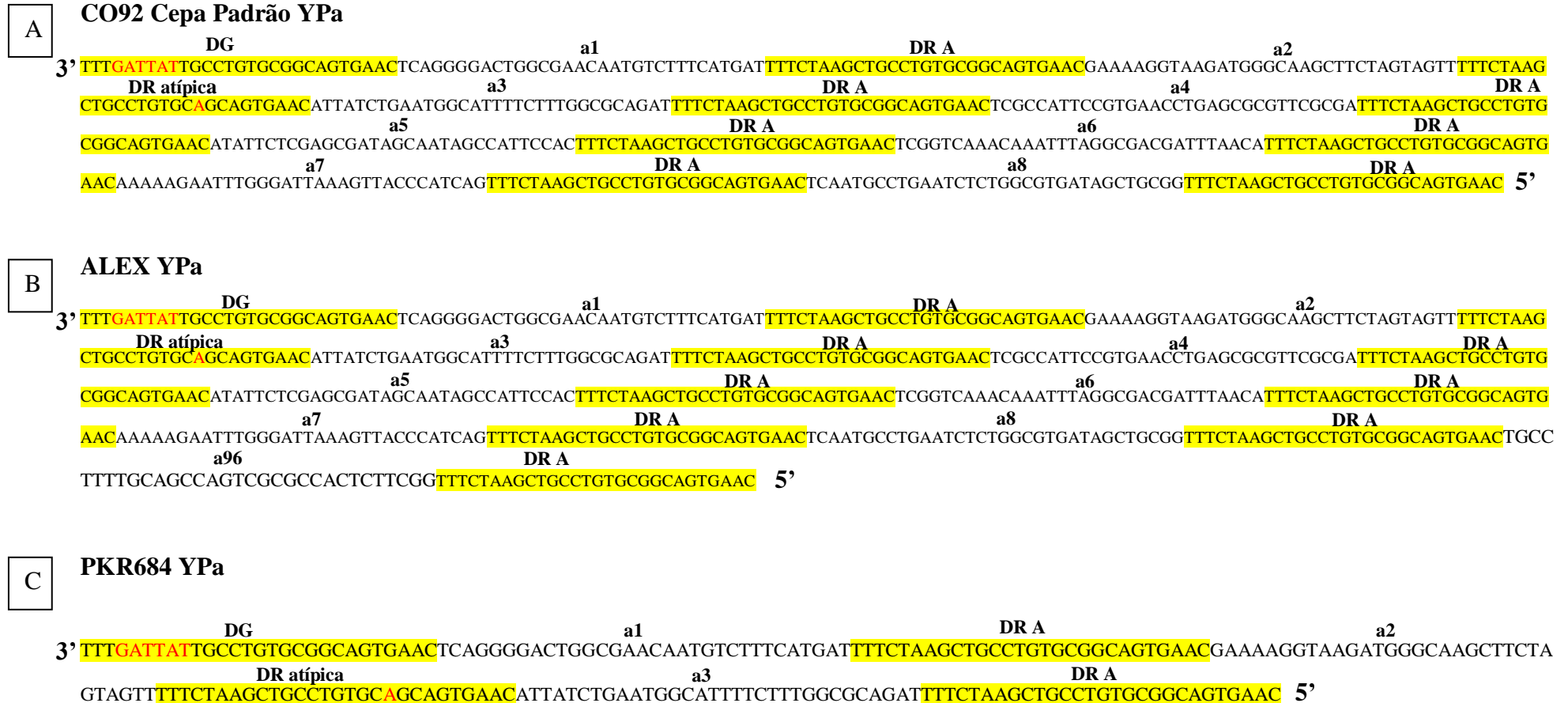


Figura 26. Representação das sequências nucleotídicas do loco YPa nas cepas de *Y. pestis* de outros focos .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Cepa padrão CO92 (A). Exemplos de inserção (B) e deleção (C) de motivos nas cepas ALEX e PKR684, respectivamente. DG: repetição degenerada, com seis nucleotídeos modificados; DR atípica: substituição nucleotídica de uma guanina por adenina; a1-a8: espaçadores padrões; a96: espaçador não descrito na literatura.

A

CO92 cepa padrão YPb

3' ^{DG} **TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b1} TCTGTACGCATACCGCCATCTTGCATCAGTCT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b2} AGCAAAAATCTTAATTACATCTGATGA
^{DR A} **TTTCGGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b3} TTTACGGCACGGCGAAAGATTCGGTTCTTGTC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b4} TTCTGGATAGGACAAATAGG
^{DR A} **ATGATTGTATCAGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b5} AACGAACCCACGTAGAATTGCCATCACCGCCGG ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

B

P.Peru YPb

3' ^{DG} **TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b1} TCTGTACGCATACCGCCATCTTGCATCAGTCT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b2} AGCAAAAATCTTAATTACATCTGATGA
^{DR A} **TTTCGGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b3} TTTACGGCACGGCGAAAGATTCGGTTCTTGTC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b4} TTCTGGATAGGACAAATAGG
^{DR A} **ATGATTGTATCAGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b5} AACGAACCCACGTAGAATTGCCATCACCGCCGG ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b52} GAGAATCGTTGC
^{DR A} **AGGATAGTTTTACCGCGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

C

KIM YPb

3' ^{DG} **TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b1} TCTGTACGCATACCGCCATCTTGCATCAGTCT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b2} AGCAAAAATCTTAATTACATCTGATGA
^{DR A} **TTTCGGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b3} TTTACGGCACGGCGAAAGATTCGGTTCTTGTC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{b4} TTCTGGATAGGACAAATAGG
^{DR A} **ATGATTGTATCAGTTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

Figura 27. Representação das sequências nucleotídicas do loco YPb nas cepas de *Y. pestis* de outros focos .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Cepa padrão CO92 (A). Exemplos de inserção (B) e deleção (C) de motivos nas cepas P.PERU e KIM, respectivamente. DG: repetição degenerada, com três nucleotídeos modificados; b1-b5: espaçadores padrões; b52: espaçador não descrito na literatura.

A

CO92 Cepa padrão YPc

3' ^{DG} **TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c1} GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c2} TTAAGTTCTTTTTGTCAGCATCTTTAA
TAAAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c3} CTGAAATACAAATAAAATAAATCGTCGAACAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

B

PBM5 YPc

3' ^{DG} **TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c1} GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c2} TTAAGTTCTTTTTGTCAGCATCTTTAA
TAAAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** ^{c3} CTGAAATACAAATAAAATAAATCGTCGAACAT ^{DR A} **TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC** 5'

Figura 28. Representação das sequências nucleotídicas do loco YPc nas cepas de *Y. pestis* de outros focos .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Cepa padrão CO92 (A). Cepa PBM5 (B). DG: repetição degenerada, com cinco nucleotídeos modificados; c1-c3: espaçadores padrões.

Como consequência da adição e/ou deleção de motivos, o número de DRs variou em dois dos locos: YPa e YPb. O loco YPa mostrou variabilidade de três a nove repetições, além da DG (Figura 29A). O loco YPb variou de duas a seis DRs, além da DG (Figura 29B); o loco YPc, por sua vez, não variou, apresentando a mesma estrutura da cepa padrão: apenas três repetições da DR, além da DG (Figura 29C).

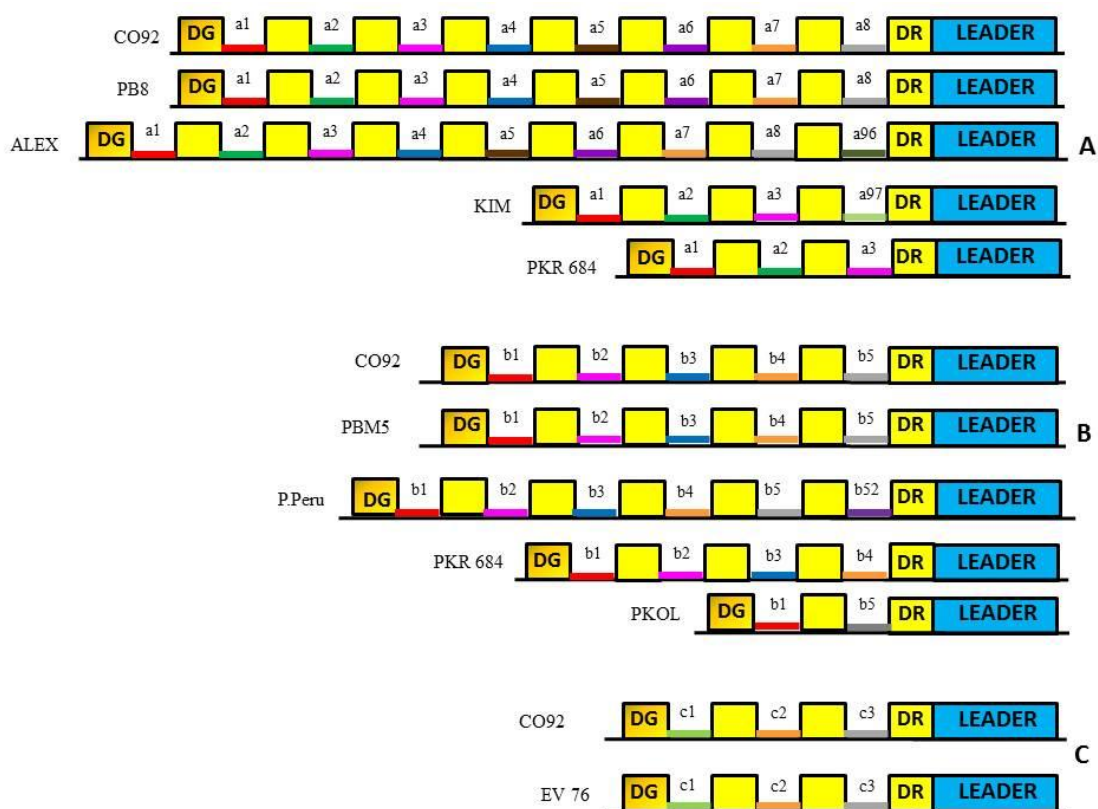


Figura 29. Representação esquemática da variação estrutural do loco YPa (A), YPb (B) e YPc (C) nas cepas de *Y. pestis* de focos de outros países.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A sequência Líder está representada em azul, as repetições diretas (DR) em amarelo, a repetição degenerada (DG) em degradê e os espaçadores em diferentes cores. Loco da cepa CO92, depositada no GeneBank, usada como padrão da organização dos locos.

Das oito cepas de *Y. pestis* de focos de outros países que foram estudadas, três apresentaram espaçadores únicos e específicos, sendo dois no loco YPa (a96 e a97) e um no loco YPb (b52) (Quadro 7). Estes espaçadores não fazem parte dos 131 espaçadores descritos na literatura.

O loco YPa apresentou de três a nove espaçadores, o YPb de dois a seis e o YPc apenas três espaçadores (Figura 29). Além da adição desses três espaçadores, observou-se também a perda de cinco espaçadores nas cepas KIM e PKR684 (a4-a8, nos dois casos) no

loco YPa; no loco YPb houve a perda de um espaçador na cepa PKR 684 (b5) e três espaçadores na cepa PKOL (b2-b4) (Quadro 3).

Baseado nos arranjos dos espaçadores e considerando a análise já realizada nas cepas brasileiras de *Y. pestis*, as oito cepas de *Y. pestis* de outros focos puderam ser agrupadas em seis perfis. O perfil mais frequente foi o PG1, agrupando três cepas (PB8, PBM5 e EV 76), resultado que coincidiu com o encontrado para as cepas brasileiras. Os perfis PG8, PG9, PG10, PG11 e PG12, foram responsáveis por cada uma das cepas restantes (PKOL, ALEX, KIM, PKR684 e P.Peru, respectivamente). Embora não tenha sido obtida a amplificação do loco YPa na cepa P.Peru, foi possível agrupá-la em um perfil exclusivo, pois os dados obtidos nos locos YPb e YPc já a enquadrava em um perfil diferente (PG12) das demais cepas analisadas.

9.3 Análise comparativa das técnicas CRISPR e MLVA

a) Tipagem das cepas brasileiras de *Yersinia pestis* através do MLVA

De acordo com o trabalho desenvolvido por Nepomuceno (2009), o qual utilizou como ferramenta molecular de tipagem o MLVA, as 43 cepas brasileiras de *Y. pestis* estudadas foram separadas em 27 perfis genotípicos, denominados de P1-P27 (Tabela 3). No entanto as cepas mostraram-se muito homogênea entre elas, diferindo em sua maioria por apenas um loco (P11 e P15); (P15 e P16); (P17 e P19), dois, três ou quatro VNTR. O perfil mais frequente foi o P11 englobando sete cepas, (P. Exu 602; P. Exu 623; P. Exu 715; P. Exu 718; P. Exu 720; P. Exu 738; P. Exu 845), seguido do P12 com seis cepas (P. Exu 363; P. Exu 365; P. Exu 793; P. Exu 798; P. Exu 813; P. Exu 822) e do P16 com três cepas (P. Exu 246; P. Exu 778; P. Exu 781). Os perfis P15, P20 e P26 agruparam duas cepas cada: P. Exu 771 e P. Exu 825, P. Exu 185 e P. Exu 351, e P. Exu 791 e P. Exu 334, respectivamente. Os perfis foram gerados de acordo com o número de cópias das unidades repetitivas (UR) e o tamanho dos amplicons obtidos pelo conjunto dos onze VNTRs analisados no trabalho, agrupando no mesmo perfil aquelas cepas que apresentavam o mesmo número de cópias e tamanho de amplicons.

A análise das 43 cepas brasileiras de *Y. pestis* pelo MLVA gerou três situações epidemiológicas: 1) cepas com diferentes características epidemiológicas enquadradas em um mesmo perfil (ex. P. Exu 738 e P. Exu 845 no P11); 2) cepas com as mesmas características epidemiológicas enquadradas em perfis genotípicos diferentes (ex. P. Exu 248 e P. Exu 249 nos P1 e P2, respectivamente); e 3) cepas com as mesmas características epidemiológicas enquadradas no mesmo perfil genotípico (ex. Exu 363 e P. Exu 365 no P12) (Tabela 3). Diante disto Nepomuceno (2009) afirmou existir diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Yersinia pestis*.

Tabela 3. Dados epidemiológicos das cepas de *Y. pestis* isoladas em três focos do Nordeste do Brasil e Perfis Genotípicos gerados pelo MLVA* e pelo CRISPR.

Cepa	Fonte	Foco	Municípios – PE	Ano de isolamento	Perfil Genotípico*	Perfil Genotípico CRISPR
P. Exu 248	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	P1	PG3
P. Exu 249	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	P2	PG3
P. Exu 832	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaimbó	1979	P3	PG3
P. Exu 827	Pulga (Pj)	Borborema	São Caetano	1979	P4	PG1
P. Exu 16	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1966	P5	PG2
P. Exu 387	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	P6	PG6
P. Exu 340	Humano	Araripe	Ipubi	1969	P7	PG5
P. Exu 15	Humano	Araripe	Exu	1966	P8	PG1
P. Exu 674	Humano	Araripe	Exu	1974	P9	PG3
P. Exu 769	Humano	Araripe	Ipubi	1975	P10	PG1
P. Exu 602	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1974	P11	PG1
P. Exu 623	Roedor (N)	Araripe	Exu	1974	P11	PG1
P. Exu 715	Roedor (N)	Araripe	Exu	1974	P11	PG1
P. Exu 718	Humano	Araripe	Exu	1974	P11	PG1
P. Exu 720	Roedor (Gs)	Araripe	Exu	1974	P11	PG1
P. Exu 738	Humano	Araripe	Araripina	1975	P11	PG1
P. Exu 845	Humano	Araripe	Ipubi	1980	P11	PG1
P. Exu 363	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	P12	PG1
P. Exu 365	Roedor (N)	Araripe	Exu	1970	P12	PG1
P. Exu 793	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	P12	PG1
P. Exu 798	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	P12	PG1
P. Exu 813	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1979	P12	PG1
P. Exu 822	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1979	P12	PG1
P. Exu 17	Humano	Triunfo	Triunfo	1966	P13	PG3
P. Exu 459	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1971	P14	PG1
P. Exu 771	Humano	Araripe	Araripina	1975	P15	PG1
P. Exu 825	Pulga (Pj)	Borborema	Tacaimbó	1979	P15	PG1
P. Exu 246	Humano	Araripe	Araripina	1968	P16	PG1
P. Exu 778	Humano	Araripe	Araripina	1975	P16	PG1
P. Exu 781	Humano	Araripe	Granito	1975	P16	PG1
P. Exu 373	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1970	P17	PG1
P. Exu 430	Roedor (Os)	Araripe	Exu	1971	P18	PG1
P. Exu 617	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1974	P19	PG1
P. Exu 185	Humano	Borborema	Caruaru	1967	P20	PG1
P. Exu 351	Humano	Triunfo	Triunfo	1969	P20	PG3
P. Exu 292	Humano	Triunfo	São José do Belmonte	1968	P21	PG1
P. Exu 312	Humano	Araripe	Exu	1969	P22	PG1
P. Exu 788	Pulga (Pj)	Araripe	Araripina	1977	P23	PG1
P. Exu 384	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1970	P24	PG1
P. Exu 787	Pulga (Pj)	Araripe	Exu	1976	P25	PG7
P. Exu 791	Roedor (N)	Triunfo	Triunfo	1978	P26	PG1
P. Exu 334	Humano	Araripe	Exu	1969	P26	PG4
P. Exu 276	Humano	Araripe	Bodocó	1968	P27	PG1

*Fonte: NEPOMUCENO (2009).

Legenda: Pulga (Pj): *Polygenes jordani*; Roedor: (N) – *Necromys*; (Os) – *Oryzomys subflavus*; (Gs) – *Galea spixi*

b) Tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* de focos de outros países através do MLVA

O estudo realizado por Nepomuceno (2009) distribuiu as oito cepas de *Y. pestis* de outros focos em oito perfis genotípicos diferentes, denominados de P28 a P35. Os perfis foram gerados usando os mesmos critérios utilizados para as cepas brasileiras de *Yersinia pestis*: o número de cópias das unidades repetitivas (UR) e o tamanho dos amplicons obtidos pelo conjunto dos onze VNTRs analisados no trabalho. De acordo com Nepomuceno (2009) não foi estabelecida nenhuma correlação relevante entre as informações epidemiológicas e genéticas entre esses perfis genotípicos.

9.3.1 CRISPR X MLVA

Comparando os resultados das duas ferramentas CRISPR e MLVA, foram observadas algumas particularidades entre os perfis genotípicos gerados com as duas técnicas. Enquanto o MLVA gerou 27 perfis genotípicos de acordo com o número de repetições encontradas nas cepas, o CRISPR produziu sete perfis genotípicos quando as 43 cepas brasileiras foram estudadas separadamente.

Quando as cepas foram analisadas com as duas técnicas moleculares, 29 perfis genotípicos foram gerados. O perfil CRISPR PG1 agrupou a maioria dos perfis genotípicos (17) gerados pelo MLVA (P8, P10, P11, P12, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P26, P27), seguido do perfil PG3 (P1, P2, P3, P4, P9, P13, P20). Perfis únicos agruparam cepas coincidentes para as duas análises: PG2 igual P5, PG4 igual a P26, PG5 igual a P7, PG6 igual a P6, PG7 igual a P25. Os perfis PG2, PG4 e PG5 são caracterizados por deleções entre os motivos do loco CRISPR, enquanto os perfis PG6 e PG7 incluíram inserções de motivos. Embora as técnicas analisem regiões diferentes no genoma, alterações foram observadas pelos dois métodos e foram necessárias para distribuição destas cepas em perfis únicos e específicos.

De acordo com os dados obtidos, os perfis genotípicos seriam específicos para determinado foco, ou pelo menos, mais disseminado entre os focos, como foi o caso do PG1 que separou as cepas dos perfis P20 e P26 agrupadas pelo MLVA e que foram isoladas em focos diferentes. Neste caso, também foi observado um perfil exclusivo do foco da chapada

do Araripe (PG4), antes agrupado com uma cepa isolado do foco da serra de Triunfo. Estes resultados reforçam a capacidade da análise dos locos CRISPR em correlacionar os dados moleculares com os dados epidemiológicos, o que não foi possível observar com a análise VNTR (Tabela 3).

A grande diversidade observada no MLVA não foi observada na análise dos locos CRISPR, provavelmente devido à região estar envolvida na codificação gênica e com maior pressão seletiva, conseqüentemente, com menor risco de sofrer mutação decorrente de armazenamento.

A combinação dos dois sistemas de tipagem foi de 0,955 e gerou 29 perfis genotípicos. De acordo com Hunter e Gaston (1988), um índice discriminatório maior que 0,90 pode ser interpretado como desejável e confiável para estudos de tipagem.

O modo como os locos CRISPR parecem evoluir nas cepas de *Y. pestis* e a frequência como adquirem novos motivos, pelo menos nas cepas do estudo, mostram que estes locos podem fornecer uma ferramenta epidemiológica poderosa em complemento com o MLVA.

10 CONCLUSÕES

- a) A análise dos locos CRISPR gerou uma valiosa caracterização epidemiológica molecular das cepas brasileiras de *Y. pestis*;
- b) Os espaçadores região específicos (RSSs) permitiram realizar uma relação geográfica dos isolados de *Y. pestis*, identificando uma distribuição regional e específica com as cepa analisadas pelo CRISPR;
- c) Foi possível observar que a maioria das cepas de *Y. pestis* de outros focos apresentou a mesma composição e o mesmo número de motivos quando comparadas com as cepas brasileiras de *Y. pestis* com apenas algumas diferenças encontradas, como adição e deleção de alguns motivos.
- d) A análise do CRISPR permitiu correlacionar a maioria das cepas estudadas com a região de isolamento das mesmas;
- e) A aplicação da análise CRISPR, em conjunto com o MLVA, favoreceu a caracterização genética - epidemiológica das cepas brasileiras de *Y. pestis*;
- f) A combinação dos dois sistemas de tipagem mostrou um alto índice discriminatório entre as cepas de *Y. pestis* podendo ser interpretado como desejável e confiável para estudos de tipagem.

REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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.

ADAIR, D. M. et al. Diversity in a variable number tandem repeat from *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1516 – 1519, 2000.

ALMEIDA, A. M. P. et al. Contribuição para o diagnóstico da peste. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, p. 53 - 55, 2007.

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

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

ANISIMOV, A. P.; AMOAKO, K. K. Treatment of plague: promising alternatives to Antibiotics. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, p. 1461-1475, 2006.

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.

ARAGÃO, A. I. et al. Tendência secular da peste no Estado do Ceará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 715 - 724, 2007.

ARAGÃO, A. I. et al. Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos, do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 42, p. 711-715, 2009.

BAQUAR, N. et al. Phage type 193 of *Salmonella typhimurium* contains different chromosomal genotypes and multiple IS 200 profiles. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 115, p. 291-295, 1994.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. The CRISPR System Protects Microbes against Phage, Plasmids. **Microbe**, Washington, v. 4, p. 224-230, 2009.

BARROS, M. P. S. **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**. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

BIK, E. M.; GOUW, R. D.; MOOI, F. R. DNA Fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 34, p. 1453-1461, 1996.

BOLOTIN, A. et al. Clustered Short Palindrome Repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, Washington, v. 151, p. 2551-2561, 2005.

BOTES, J. et al. Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Ribotyping and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 231-240, 2003.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde . A peste humana In: _____ **Manual de Vigilância e Controle da Peste**. 1. ed. Brasília, 2008, p. 33 - 42.

BROUNS, S. J. J. et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. **Science**, Washington, v. 321, p. 960-964, 2008.

BRUDEY, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BioMed Central Microbiology**, London, v. 6, p.23, 2006.

BUTLER, T. Plague into the 21st century. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 49, p. 736 – 742, 2009.

CARNIEL, E. Pathogenic *Yersinia*: Stepwise Gain of Virulence due to Sequential Acquisition of Mobile Genetic Elements. In Hensel, H.; Schmidt, M. (Ed.). **Horizontal gene transfer in the evolution of pathogenesis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 193-216.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Atlanta). **Plague**. Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil>>. Acesso em: 2 fev. 2010.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Atlanta). **Plague**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/epi.htm>> Acesso em: 2 fev. 2010.

CHU, M. **Laboratory manual of plague diagnosis tests**. World Health Organization, Geneve, 2000. p. 129.

COSTA, F. et al. Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 46, p. 445-449, 2008.

CUI, Y. et al. Insight into Microevolution of *Yersinia pestis* by Clustered Interspaced Short Palindromic Repeats. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. 2652, 2008.

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**, Wahington, 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*. **Journal of General Microbiology**, London, v.150, p. 199 - 204, 2004.

DEN DUNNEN, J. T.; VAN OMMEN, G. J. B. Methods for Pulsed-Field Gel Eletrophoresis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 38, p. 161-177, 1992.

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

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

DEVEAU, H. et al. Phage response to CRISPR – encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, p 1390 – 1400, 2007.

FARLOW, J. et al. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeats analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3186 - 3192, 2001.

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.

FILLIOL, I. et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 1963-1970, 2003.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.153, n.12, p.1135 - 1141, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Peste In_____: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF, 2002. p. 641 - 652.

GAGE, K. L.; DENIS, D. T.; TSAI, T.F. Prevention of plague: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 45, p. 1 - 15, 1996.

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

GRAMMENO, P. et al. PFGE analysis of enterococci isolates from recreational and drinking water in Greece. **Journal of Water and Health**, Londres, v. 4, p. 263-269, 2006.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales de l'Institut Pasteur Microbiology**, Paris, v. 137B, p. 165-175, 1986.

GRISSA, I. et al. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. **Biochimie**, London, v. 90, p. 660 – 668, 2008.

GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, Paris, v. 35, p. 52 - 57, 2007.

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.

HAFT, D. H. et al. A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. **PLoS One**, San Francisco, v. 1, p. 474-483, 2005.

HINNEBUSCH, B. J. The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. **Current Issues In Molecular Biology**. Londres, v. 7, p. 197 - 212, 2005.

HORVATH, P. et al. Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v 190, p. 1401-1412, 2008.

HORVATH, P. et al. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, p. 62-70, 2009.

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.

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: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 283, p. 2281 - 2290, 2000.

JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 1565 - 1575, 2002.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. **Nature**, London, v. 316, p. 76-79, 1985.

KARGINOV, F. V.; HANNON, G. J. The CRISPR system: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 37, p. 7-19, 2010.

KARIMI, Y. Diagnostic rapid de l'infection Pesteuse au laboratoire. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v. 71, p. 45 - 48, 1978.

KEIM, P. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 2928 – 2936, 2000.

KLEVYTSKA, A. M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3179 - 3185, 2001.

KOIRALA, J. Plague: disease, management, and recognition of act of terrorism. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 20, p. 273 – 287, 2006.

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

KUNIN, V.; SOREC, R.; HUGENHOLTZ, P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPRs repeats. **Genome Biology**, London, v. 8, p. R61.1-R61.8, 2007.

LE FLÈCHE, 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, p.2, 2001.

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, N. C. et al. Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in Northeast Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 40 - 45, 1997.

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

LEAL, N. C. et al. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 447 - 454, 2004.

LEAL, N. C. **Potencial do uso de PCR e Hibridização com sondas moleculares no estudo *Yersinia pestis***. 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 339 - 342, 1999.

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 - 732, 2004.

LEAL-BALBINO, T. C. et al. The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 99, p.727 - 732, 2006.

LEAL-BALBINO T. C. et al. Peste e Tularemia In: MARCONDES, C. B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 5, p.70 – 83.

LI, Y. et al. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, p.1-9, 2009.

LILLESTOL, R. K. et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. **Archaea**, Victoria, v. 2, p. 59-72, 2006.

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.

MAKAROVA, K. S. et al. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Research**, Paris, v. 30, p. 482-496, 2002.

MANDIN, P. et al. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 962-974 , 2007.

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. Self non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. **Nature**, Paris, v. 463, p. 568-571, 2010.

MCGOVERN, T. W.; FRIEDLANDER, A. Plague. In: Zajtchuk, R; Bellamy, R. F., editors. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Bethesda: Office of the Surgeon General, 1997. p.479 – 502.

MERHEJ, V. et al. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 779-784, 2008.

MOJICA, F. J. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal Molecular Evolution**, New York, v. 60, p. 1-8, 2005.

MOKROUSOV, I. et al. *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 2, p. 901-906, 2007.

MORELLI, G. et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. **Nature genetics**, New York, v. 42, p. 1140-1143, 2010.

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

NAKAMURA, Y. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, Washington, v. 235, p. 1616-1622, 1987.

NEPOMUCENO, M. R. A. **Epidemiologia molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no nordeste do Brasil pela Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA)**. 2009 Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

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

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

OOST, J. et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 34, p. 401-407, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Plague Manual: Epidemiology, distribution, surveillance and control**. Geneve, 1999. p. 172.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Human Plague: review of regional morbidity and mortality, 2004 – 2009. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 85, p. 40 – 45, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Plague in the Americas**, Washington, v.115, p. 156, 1965.

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

PEREIRA, M. S. V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR 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*. **BioMed Central Microbiology**, London, v.4, p.22, 2004.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, New York, v. 151, p. 653 – 663, 2005.

PRENTICE, M. B.; RAHALISON, L. **Plague**. *Lancet*, v. 369, p. 1196-207, 2007.

PRICE, E. P. et al. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 73, n°10, p.3431-3436, 2007.

RODRIGUEZ-LAZARO, D. et al. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, p. 306-319, 2007.

RORING, S. et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2126 - 2133, 2002.

SILVA, A. C. M. **Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do Estado do Ceará, Brasil, por RFLP – IS100**. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.

SOBREIRA, M. **Análise das Regiões Espaçadoras Intergênicas do rRNA 16S-23S em Diferentes Gêneros Bacterianos**. 2002. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

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

SPRAGUE et al. *Yersinia similis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Reading, v. 58, p. 952-958, 2008.

STENSETH, N. C. et al. Plague: Past, Present and Future. **PLOS Medicine**, San Francisco, v. 5, 2008.

SULAKVELIDZE, A. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 497–513, 2000.

TAMURA, K et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAMURA, K et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, 2011. No prelo.

TANG, T. H. et al. Identification of novel non-coding RNA as potential antisense regulators in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 55, p. 469-481, 2005.

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.

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

TOMASO, H. et al. Rapid detetion of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. Federation of European Microbiological Societies. **Immunology and Medical Mirobiology**, Amsterdan, v. 38, p. 117-126, 2003.

TOUCHMAN, J. W. et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, p.1-5, 2007.

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

WILLKOMM, D. K. et al. Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. **Nucleic Acids Research**, Paris, v. 33, p. 1949–1960, 2005.

XIA, X. et al. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, v. 129, p 93-38, 2009.

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.

ZINK, A. R. et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 359-367, 2003.