



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



Mirele Regina de Araújo Nepomuceno

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

RECIFE
2009

Mirele Regina de Araújo Nepomuceno

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

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

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

Recife
2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

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

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

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

CDU 616.98

MIRELE REGINA DE ARAÚJO NEPOMUCENO

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

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

Aprovado em: 15 / 04 / 2009

Banca Examinadora

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

Membro Externo / Titular: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

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

Membro Interno / Titular: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Imunologia

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARAÚJO-NEPOMUCENO, Mirele Regina. **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.

RESUMO

A *Yersinia pestis* é o agente etiológico da peste, uma doença primária de roedores, transmitida por pulgas infectadas e que pode infectar o homem e outros mamíferos. O objetivo do trabalho foi realizar a tipagem de 63 cepas de *Y. pestis* de três focos de peste do PE. As cepas foram isoladas de diferentes fontes e períodos. Das 63 cepas, 20 foram isoladas de um epizootia, em agosto de 1967, na Chapada do Araripe-PE. Também foram estudadas oito cepas de *Y. pestis* isoladas em outros países, cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* e nove de *Y. enterocolitica*. Foram utilizados onze VNTRs pela técnica do MLVA. Dos onze VNTRs para as cepas da epizootia apenas um revelou-se polimórfico apresentando diferentes alelos. Os demais VNTRs revelaram-se monomórficos. Entre os onze VNTRs analisados para as 51 cepas de *Y. pestis* (43 brasileiras e 8 estrangeiras) dois se revelaram monomórficos gerando *amplicons* com 7 e 2 unidades repetitivas (UR). Os outros nove VNTRs analisados revelaram-se polimórficos gerando dois a oito alelos. As cepas de *Y. pseudotuberculosis* apresentaram-se polimórficas para 10 VNTRs gerando *amplicons* de tamanhos diversos, o VNTR ms09 foi o único monomórfico gerando um *amplicon* de 700 pb com 28 UR. Das nove cepas de *Y. enterocolitica* analisadas com os onze locos, sete apresentaram-se monomórficos com *amplicons* de 700, 250, 270, 690, 231 e 379 pb. Os outros quatro VNTRs analisados apresentaram um padrão de amplificação polimórfico com *amplicons* de tamanhos diferentes para o mesmo loco. O padrão de amplificação gerado com as cepas de *Y. pestis* possibilitou distribuí-las em 35 perfis genotípicos. A análise das cepas pelo dendrograma permitiu agrupá-las em cinco clados, onde no clado I ficaram agrupadas a maioria das cepas brasileiras de *Y. pestis*, as cepas estrangeiras de *Y. pestis* ficaram agrupadas nos clados II e IV, enquanto que *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* ficaram nos clados III e V respectivamente. Diante disso pode-se considerar que o MLVA mostrou-se uma ferramenta útil em estudos filogenéticos e epidemiológicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, além de estudos intraespecíficos com as espécies de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. As análises revelaram diversidade genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes e períodos e sua continuação poderá gerar dados importantes para estabelecer relações filogenéticas entre as cepas, contribuindo para um melhor entendimento da disseminação e transmissão do agente etiológico da peste na natureza e a dinâmica da epidemiologia no Brasil.

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

ARAÚJO-NEPOMUCENO, Mirele Regina. **Molecular Epidemiology from *Yersinia pestis* strains isolated in Brazil for Multiple Locus Variable Analysis (MLVA)**. 2009. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

The *Yersinia pestis* is the agent who causes the plague, a primary illness of rodents, transmitted by infected fleas and it can infect human and other mammals. This work had as objective to carry through the typing of 63 *Y. pestis* strains from Brazil northeast foci. The strains had been isolated of different sources and periods. By 63 strains, 20 had been isolated during an epizootic, 1967 August, in Chapada of Araripe – PE. Also it had been studied eight *Y. pestis* strains isolated in other countries, five *Y. pseudotuberculosis* strains and nine *Y. enterocolitica* strains. It had been used eleven VNTRs for the MLVA. Of the eleven VNTRs for epizootic strains only one showed polymorphic presenting different alleles. The majority VNTRs had shown monomorphics. From 51 *Y. pestis* strains (43 Brazilians and 8 foreigners) two between eleven VNTRs analyzed had disclosed to monomorphics generating amplicons with 7 and 2 repetitive units (UR). The others nine VNTRs analyzed had shown polymorphics generating the two until eight alleles. From 10 VNTRs for *Y. pseudotuberculosis* strains had been presented polymorphics, generating amplicons of diverse sizes. The ms09 VNTR was the only monomorphic generating one amplicon of 700 pb with 28UR. From nine *Y. enterocolitica* strains analyzed with the eleven VNTRs, seven had been presented monomorphics with amplicons by 700, 250, 270, 690, 231 and 379 pb. The others four analyzed VNTRs had presented a polymorphic standard of amplification for *Y. enterocolitica* strains, showing amplicons of different sizes for the same lease. The standard of amplification generated with *Y. pestis* strains possible classify them in 35 genotypic profiles. The analysis of strains by the dendrogram allowed to group them in five clads, where in the clado I it had been grouped the majority of *Y. pestis* Brazilian strains, *Y. pestis* foreign strains had been grouped in clads II and IV, whereas *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* had been in clads III and the V respectively. Ahead this can be considered the MLVA like a useful tool in filogenetics and epidemiologists studies for *Y. pestis* Brazilian strains, beyond intraespecifics studies with *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* species. The analyses had disclosed genetic diversity between *Y. pestis* strains isolated of different sources and periods and its continuation will be able to generate given important to establish phylogenetics relations between the *Y. pestis* Brazilians strains, contributing for a better understanding of the dissemination and transmission of the plague's agent etiologic in the nature and the dynamics of the plague epidemiology in Brazil.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Áreas de Peste no Brasil.....	17
Figura 2:	Esquema do ciclo epidemiológico da Peste	20
Figura 3:	Vizualização por microscopia óptica da <i>Y. pestis</i> (seta) em tecido de um paciente infectado.....	21
Figura 4:	Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguinais (C e D).....	23
Figura 5:	Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Y. pestis</i>	28
Figura 6:	Esquema representativo do VNTR tetranucleotídeo CAAA	33
Figura 7:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	55
Figura 8:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	56
Figura 9:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de <i>Y. pestis</i>	57
Figura 10:	Dendrograma UPGMA mostrando a relação das cepas de <i>Yersinia</i> estudadas, os números de unidades repetitivas de cada cepa com os onze locos VNTRs e seus perfis genotípicos	58
Figura 11:	Gráfico de barras demonstrando a relação entre os VNTRs e o número de alelos encontrados nas diferentes espécies de <i>Yersinia</i>	59
Figura 12:	Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTRs em culturas das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas durante a epizootia.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas nos focos do Nordeste do Brasil e Perfis Genotípicos gerados neste estudo	51
Tabela 2: Características das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas durante uma epizootia de Peste na Chapada do Araripe – PE, data de isolamento e procedência das cepas. Resultado da análise pelo MLVA com o VNTR ms06	52
Tabela 3: Dados epidemiológicos e perfis genotípicos das cepas de <i>Y. pestis</i> isoladas em focos de outros países.....	52
Tabela 4: Dados epidemiológicos das cepas de <i>Y. enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i> estudadas com os 11 VNTRs analisados e os perfis genotípicos gerados	53
Tabela 5: Características dos VNTRs analisados nas cepas de <i>Yersinia</i>	54

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Histórico da Peste	15
2.2	Definição da Peste	16
2.3	Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo	16
2.4	Epidemiologia da Peste	18
2.5	Agente Etiológico da Peste	20
2.6	Formas Clínicas	22
2.7	Diagnóstico Laboratorial da Peste	24
2.7.1	<i>Diagnóstico Bacteriológico</i>	24
2.7.1.1	<u>Exame Direto</u>	24
2.7.1.2	<u>Cultura</u>	24
2.7.2	<i>Diagnóstico Sorológico</i>	25
2.7.3	<i>Diagnóstico Molecular</i>	25
2.8	Tratamento, Prevenção e Controle da Peste	25
2.9	Genoma da <i>Yersinia pestis</i>	27
2.9.1	<i>O cromossomo da Yersinia pestis</i>	28
2.9.2	<i>Os plasmídeos da Yersinia pestis</i>	28
2.9.2.1	<u>Plasmídeo pYV ou pCD1</u>	29
2.9.2.2	<u>Plasmídeo pPst ou pCP1</u>	29
2.9.2.3	<u>Plasmídeo pFra ou pMT1</u>	30
2.10	Epidemiologia Molecular	30
3	JUSTIFICATIVA	34
4	PERGUNTA CONDUTORA	36
5	HIPÓTESE	37
6	OBJETIVOS	38
6.1	Geral	38
6.2	Específicos	38

7	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
7.1	Cepas Estudadas.....	39
7.2	Bactérias e Condições de Cultivo.....	39
7.3	Extração do DNA Genômico.....	40
7.4	Tipagem molecular pela análise dos múltiplos locos VNTR (MLVA).....	41
7.5	Análise dos Dados obtidos pelo MLVA.....	42
7.5.1	<i>Determinação do Número de Repetições.....</i>	42
7.5.2	<i>Análise discriminatória dos locos VNTRs</i>	42
8	RESULTADOS	44
8.1	Tipagem Molecular pelo MLVA (Análise dos VNTRs)	44
8.1.1	<i>Análise das cepas de Y. pestis isoladas nos três focos de peste do estado de PE e de focos de outros países</i>	44
8.1.2	<i>Análise das cepas de Y. pestis isoladas durante uma epizootia de peste em 1967 no foco da Chapada do Araripe – PE</i>	47
8.1.3	<i>Análise das cepas de Y. enterocolitica.....</i>	47
8.1.4	<i>Análise das cepas de Y. pseudotuberculosis</i>	49
9	DISCUSSÃO	61
10	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE – Artigo Científico.....	77

1 INTRODUÇÃO

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

A Peste foi introduzida no Brasil, em 1899, pelo porto de Santos-SP durante a última pandemia, focalizando-se principalmente no Nordeste, tornando-se um agravo de interesse regional. Os focos brasileiros estão localizados nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1965).

A vigilância da Peste no Brasil baseia-se na pesquisa da bactéria em roedores e pulgas e de anticorpos antipestosos em animais sentinela (algumas espécies de roedores resistentes à infecção e carnívoros domésticos, como os cães e gatos). A partir de 1966, com o Plano Piloto de Peste em Exu (PPP), as atividades de vigilância e controle da Peste no Brasil permitiram a obtenção de 917 cepas de *Y. pestis* oriundas de roedores, pulgas e humanos, com o último espécime sendo isolado em 1997 e que são conservadas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM) (ALMEIDA et al., 1985).

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

Apesar dos vários estudos realizados com *Y. pestis* utilizando diferentes técnicas moleculares, nenhuma correlação entre as diferenças observadas e as características epidemiológicas dos isolados foi encontrada. Além de apresentarem um baixo poder

discriminatório, revelando na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas oriundas de diferentes fontes, ano e local de isolamento, demonstrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos.

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

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

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Peste

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2 Definição da peste

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

2.3 Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo

No Brasil existem dois principais focos naturais de peste: na região Nordeste e na Serra dos Órgãos, no estado do Rio de Janeiro. O foco do Nordeste está localizado na região

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

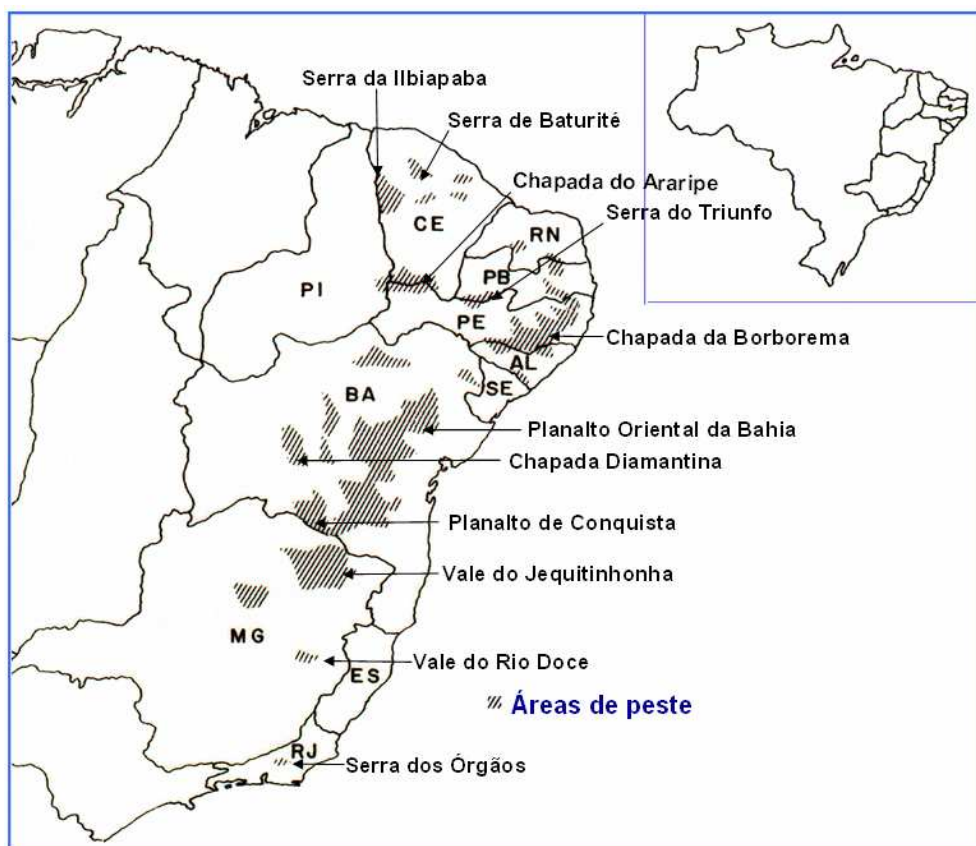


Figura 1: Áreas de Peste no Brasil.
Fonte: Almeida et al. (2005).

O foco do Nordeste produzia até 1980 de 20 a 100 casos de peste por ano, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. Desde então, houve um decréscimo substancial no registro dos casos. Os últimos registros de peste humana ocorreram nos Estados do Ceará e Paraíba nos anos 80. Durante a última década, alguns casos humanos suspeitos, clínicos e epidemiologicamente ainda foram notificados no Ceará e na Bahia. Contudo, somente dois deles, ocorridos no Ceará, foram confirmados, um por isolamento da bactéria, em Ipu no ano de 1997 e,

um por exame sorológico, em Guaraciaba do Norte no ano de 2005, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos (ALMEIDA et al., 2005).

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

Nos últimos dez anos, graves epidemias de peste foram registradas na África principalmente em Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia, e recentemente na RDC (República Democrática do Congo). Casos esporádicos de peste têm ocorrido em vários países das Américas (EUA, Peru, Brasil e Bolívia), na Ásia Central (Uzbequistão, Turcomenistão e Kazakhstão), China, Mongólia e Vietnã (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Em 2006, um total de 13 casos de peste humana foi registrado entre habitantes de quatro estados dos EUA: Novo México (sete casos), Colorado (dois casos), Califórnia (três casos) e Texas (um caso). Este é o maior número de casos registrados em um ano nos Estados Unidos desde 1994 (HUMAN PLAGUE, 2006). Depois de décadas de silêncio a peste reemergiu na Índia, Argélia e Equador (BERTHERAT, 2007).

2.4 Epidemiologia da Peste

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

A peste está incluída, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre as doenças re-emergentes, em vista da ocorrência de epidemias em vários países da África, Ásia e do Continente Americano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). No Brasil a incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias declinaram nas áreas de foco, entretanto, atividade residual de peste tem sido detectada nos animais sentinelas, exigindo vigilância permanente dos focos.

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

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

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

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

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

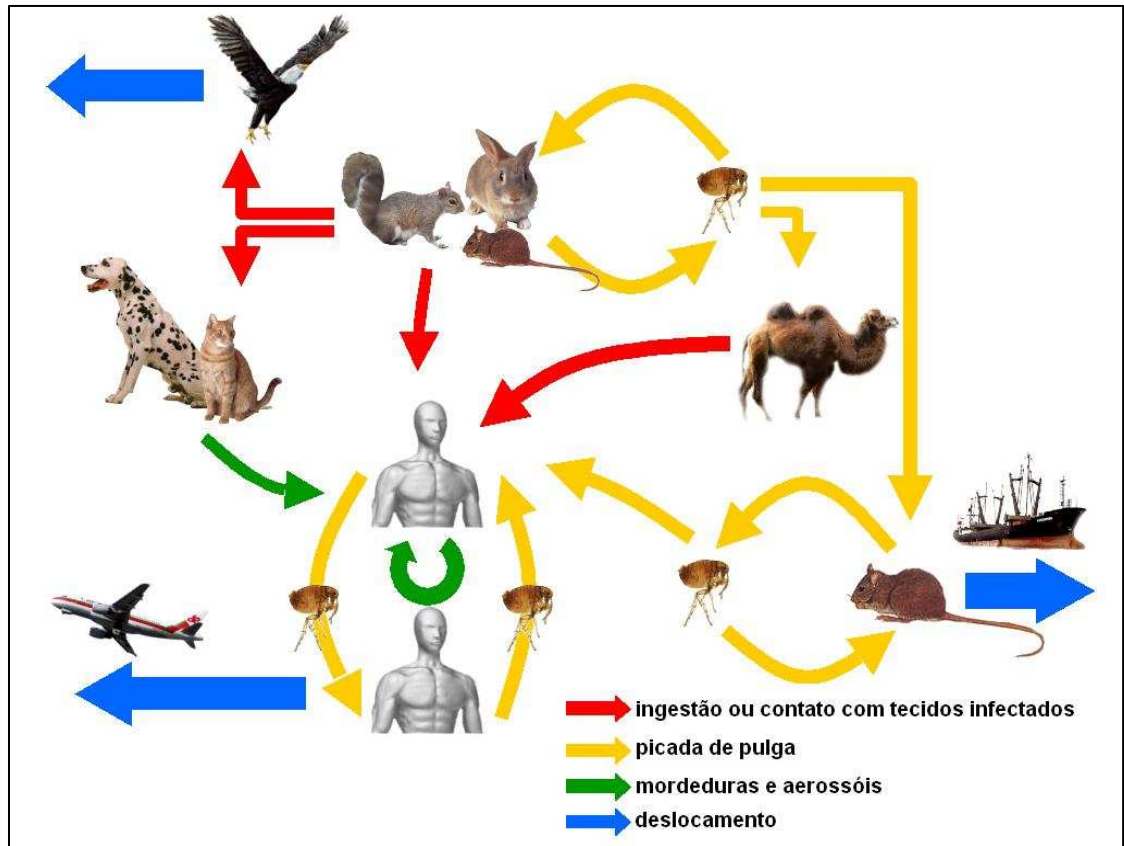


Figura 2: Esquema do ciclo epidemiológico da Peste.
Fonte: Leal-Balbino et al. 2009.

2.5 Agente Etiológico da Peste

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

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

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

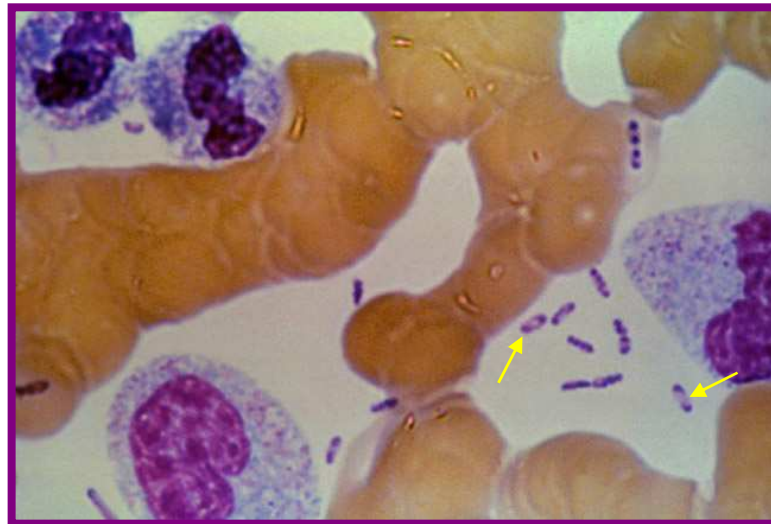


Figura 3: Visualização por microscopia óptica da *Y. pestis* (seta) em tecido sangüíneo de um paciente infectado. Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/index.htm>.

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

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

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

2.6 Formas Clínicas

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

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

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

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

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

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



Figura 4: Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguiniais (C e D).
Fonte: http://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/manual_pestes.pdf

2.7 Diagnóstico Laboratorial da Peste

O diagnóstico laboratorial da peste é realizado por técnicas bacteriológicas (identificação e isolamento da bactéria), sorológicas (detecção de anticorpos antipestosos) e mais recentemente por técnicas moleculares. Para análise bacteriológica podem ser utilizadas cepas de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica no homem, além de sangue, vísceras de roedores e macerados de pulgas. O diagnóstico sorológico é realizado em soro humano, de roedores e de outros mamíferos. O diagnóstico molecular consiste na identificação de genes plasmidiais e/ou cromossomais da *Y. pestis* (CHU, 2000).

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

2.7.1 Diagnóstico Bacteriológico

2.7.1.1 Exame Direto

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

2.7.1.2 Cultura

Para identificação da *Y. pestis* as cepas são cultivadas em duas placas para Agar sangue (Blood Agar Base = BAB, Difco) a 28°C em pH na faixa de 7,4 a 7,6 por 48 a 72 horas. Depois do semeio adiciona-se uma gota do fago antipestoso específico em uma das

placas. As colônias apresentam tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante-translúcido e bordas inteiras. No ponto da cultura onde foi colocado o bacteriófago forma-se uma área de lise das colônias (KARIMI, 1978).

2.7.2 Diagnóstico Sorológico

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

2.7.3 Diagnóstico Molecular

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

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

2.8 Tratamento, Prevenção e Controle da Peste

O tratamento da peste deve ser precoce e intensivo devido à rapidez e a gravidade da evolução da doença, visando deter a bacteremia e superar a toxemia. A coleta de espécimes para os exames bacteriológicos deve ser realizada antes do uso do antimicrobiano, mas não se

pode retardar os procedimentos a espera da confirmação laboratorial. No Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) recomenda-se o isolamento do paciente durante as primeiras 48 horas do tratamento devido ao risco de pneumonia (ALMEIDA et al., 2005).

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

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

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

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

2.9 Genoma da *Yersinia pestis*

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

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

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

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

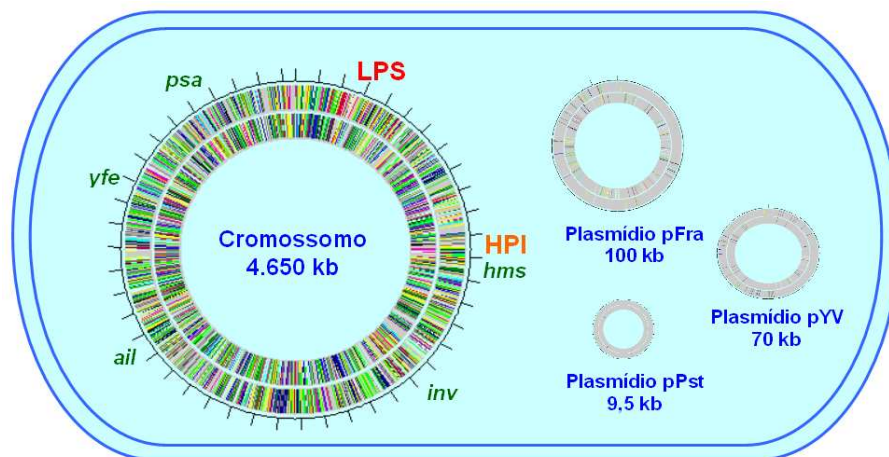


Figura 5: Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Y. pestis*.
Fonte: Cedido por Leal – Balbino, TC.

2.9.1 O cromossomo da *Yersinia pestis*

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

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

2.9.2 Os plasmídeos da *Yersinia pestis*

Nos diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil, foram encontradas cepas atípicas faltando algum plasmídeo ou contendo plasmídeos adicionais (FILIPPOV et al., 1990; LEAL et al., 1997; 2000). Também já foram relatados casos de cepas de alguns focos

de peste que apresentaram plasmídeos crípticos com a aquisição de genes de resistência (GUIYOULE et al., 2001; PERRY; FERTHERSTON, 1997).

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

2.9.2.1 Plasmídeo pYV ou pCD1

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

2.9.2.2 Plasmídeo pPst ou pCP1

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

2.9.2.3 Plasmídeo pFra ou pMT1

O plasmídeo pFra (90 – 110kb) codifica uma proteína capsular ou fração F1 que desempenha uma atividade antifagocítica (DU et al., 2002) e a toxina murina, Ymt, que parece estar envolvida na transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSH, 2002). A F1 é imunogênica para o homem e outros mamíferos e é largamente utilizada nos testes de diagnóstico da peste, seja pela pesquisa de anticorpos anti-F1 ou pela identificação do gene estrutural da F1, o *caf 1* (CHU, 2000). Este plasmídeo possui uma cópia do elemento de inserção IS200, duas cópias do IS100 e uma cópia do IS285 (LINDLER et al., 1998).

2.10 Epidemiologia Molecular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

No Brasil, estudos de tipagem molecular para *Y. pestis* utilizando diferentes técnicas: RAPD (LEAL, 1998), PCR-ribotipagem (SOBREIRA, 2002), PFGE (BARROS, 2007) demonstraram na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes, ano e local de isolamento. Recentemente uma análise de algumas cepas isoladas no Nordeste do Brasil pelo MLVA revelou que elas apresentavam diversidade genética (ARAÚJO, 2005, 2007; OLIVEIRA, 2006; VALDEVINO NETO, 2006).

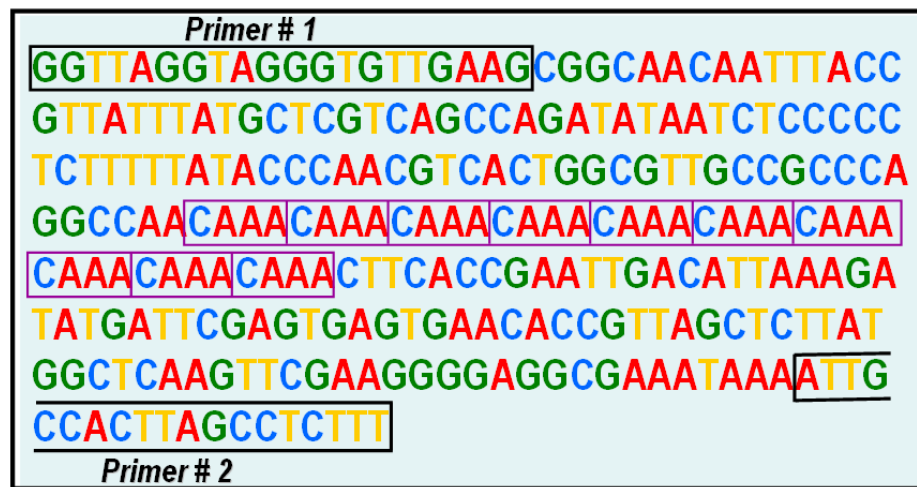


Figura 6: Esquema representativo do VNTR tetranucleotídeo CAAA.
 Fonte: Baseado em Adair et al. (2000).

3 JUSTIFICATIVA

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

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

Em 2005, ocorreram 1.124 casos de peste em nove países sendo 99 fatais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). No Brasil, em 1997, ocorreu um caso humano em Ipu-Ceará e em 2005 houve outro caso humano curado também no Ceará, o que reforça a importância de manter a vigilância nos focos (CDTV/CGDT/SVS/MS).

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

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

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

4 PERGUNTA CONDUTORA

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

5 HIPÓTESE

Existe relação genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes eventos epidemiológicos dos três focos de peste do estado de PE.

O MLVA permite demonstrar a relação genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes eventos epidemiológicos dos três focos de peste do estado de PE.

O MLVA é um marcador molecular eficaz no estudo intraespecífico do gênero *Yersinia*.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

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

6.2 Específicos

Identificar os padrões de tipagem das cepas brasileiras de *Y. pestis* pela análise dos locos VNTRs (MLVA), estabelecendo a relação genética entre as cepas e os dados epidemiológicos;

Avaliar a aplicação de diferentes locos VNTRs para tipagem molecular das cepas de *Y. pestis*;

Verificar a eficácia do MLVA como marcador molecular na caracterização das cepas brasileiras de *Y. pestis*.

Comparar o perfil genotípico encontrado nas cepas de *Y. pestis* com as cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* para estabelecer a relação entre essas espécies e avaliar o MLVA como marcador molecular intraespecífico para o gênero *Yersinia*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Cepas Estudadas

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

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

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

7.2 Bactérias e Condições de Cultivo

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

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

7.3 Extração do DNA Genômico

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

O outro protocolo foi realizado como descrito em SOUZA et al (2007). Foi utilizado um mililitro da cultura em BHI que foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 500µl de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado homogeneizado com 500µl de TE, 10µl de lisozima (10mg/ml) e 10µl de proteinase K (5mg/ml). A suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos seguido da adição de 100µl de STE (SDS 2,5%, Tris-HCl 10mM pH8,0; EDTA 0,25M), 15 minutos de incubação a 60°C, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130µl de acetato de amônio 7,5M, mantida no banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos. Aproximadamente 700µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol a -70°C por 30 minutos ou a -20°C por 24 horas seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspensa em 10µl de água mili Q e conservado a -20°C. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V usando tampão TBE (Tris-borato 0,089 M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V. A

visualização do DNA foi observado sob luz UV após coloração em solução de brometo de etídio (15mg/ml). A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *HindIII* usando o programa 1D Image Analysis, versão 3.5 (Kodak Digital Science).

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

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

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

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

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

7.5 Análise dos Dados obtidos pelo MLVA

7.5.1 Determinação do Número de Repetições

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

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

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

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

7.5.2 Análise discriminatória dos locos VNTRs

O poder discriminatório para o método de tipagem molecular MLVA e pela análise de cada VNTR estudado, foi determinado de acordo com o índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988). O valor *D* indica a probabilidade em que dois isolados, aleatoriamente

selecionados dentro da população testada, serão classificados em diferentes tipos. A seguinte fórmula foi utilizada:

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

onde D = índice discriminatório, s = número total dos tipos diferentes, n_j = número de isolados representando cada tipo e N = número total de isolados na amostra populacional. Segundo Hunter e Gaston (1988), um índice D superior a 0,90 pode ser interpretado como confiante e desejável.

8 RESULTADOS

8.1 Tipagem Molecular pelo MLVA (Análise dos VNTRs)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

De acordo com o índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988) o poder discriminatório com os 11 VNTRs analisados nas cepas de *Y. pestis* isoladas nos três focos de peste do estado de PE foi de 0,95. O índice discriminatório foi calculado também individualmente para cada VNTR analisado neste estudo nas cepas brasileiras de *Y. pestis*. Para o VNTR ms06 o índice foi de 0,44; VNTR ms 09 foi 0,05; VNTR ms46 foi 0,38; VNTR ms62 foi 0,26; VNTR ms07 foi 0,68; para o VNTR ms20 foi 0,14; para o VNTR ms04 foi 0,61; para o VNTR ms05 foi 0,046 e para os VNTRs ms54, ms 30 e ms45 foi 0 (zero);

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

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

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

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

Apenas o VNTR ms06 revelou-se polimórfico, gerando três alelos com 8, 9 e 10 UR referentes a 605, 665 e 725 pb respectivamente (Figura 12 J; Tabela 2). O alelo de 605 pb foi encontrado em 18 culturas, cinco do primeiro subcultivo e em 13 do segundo; o alelo de 665 pb foi observado em três culturas, uma do primeiro subcultivo e duas do segundo e para o alelo de 725 pb apenas uma cultura do segundo subcultivo foi verificada (Tabela 2). As culturas pareadas das duas cepas (P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S) demonstraram para este VNTR 8UR referentes a 605 pb (Tabela 2).

8.1.3 Análise das cepas de *Y. enterocolitica*

Nove cepas de *Y. enterocolitica* foram analisadas pelo marcador molecular MLVA para comparação com as cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* e avaliação do marcador. Os onze locos VNTRs foram amplificados nas nove cepas de *Y. enterocolitica*, com exceção

da cepa Ye 37 analisada com o VNTR ms06, e das cepas Ye 43p e Ye 25L analisadas com o VNTR ms05, que não foi possível obter a amplificação desta regiões nestas cepas (Tabela 4).

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

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

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

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

8.1.4 Análise das cepas de *Y. pseudotuberculosis*

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

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

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

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

Com base no padrão de amplificação das cepas de *Y. pseudotuberculosis* foi possível agrupar as cinco cepas de *Y. pseudotuberculosis* em cinco perfis genotípicos distintos, denominados neste trabalho de P42 a P46 (Tabela 4). Apesar de não obter amplificação de dois VNTRs com duas cepas (IP31553 e IP32952) foi possível agrupá-las em perfis

genotípicos próprios, pois os dados obtidos na análise dos outros VNTRs as enquadravam nos perfis genotípicos diferentes (P42 e P45) das demais cepas de *Y. pseudotuberculosis*, analisados pelo MLVA com os 11 locos VNTR (Tabela 4).

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

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

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

Fonte: OLIVEIRA, 2006; ARAÚJO-NEPOMUCENO, 2009.

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

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

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

Fonte: MELO-OLIVEIRA, 2009 (Artigo enviado para publicação); ARAÚJO-NEPOMUCENO, 2009.

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

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

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

Fonte: OLIVEIRA, 2006; ARAÚJO-NEPOMUCENO, 2009.

Nota: s/i: Sem informacao.

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

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

Fonte: OLIVEIRA, 2006; ARAÚJO-NEPOMUCENO, 2009.

Nota: UR: Unidade de repetição. Ye: *Y. enterocolitica*; IP: *Y. pseudotuberculosis*; R: Roedor; B: Bovino; H: Humano; S: Suíno; RJ: Rio de Janeiro; s/i: Sem informacao. (*) Não houve amplificação. PG – Perfil Genotípico. (–) Perfil genotípico não identificado.

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

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

Fonte: LE FLËCHE, 2001; ARAÚJO-NEPOMUCENO, 2009.

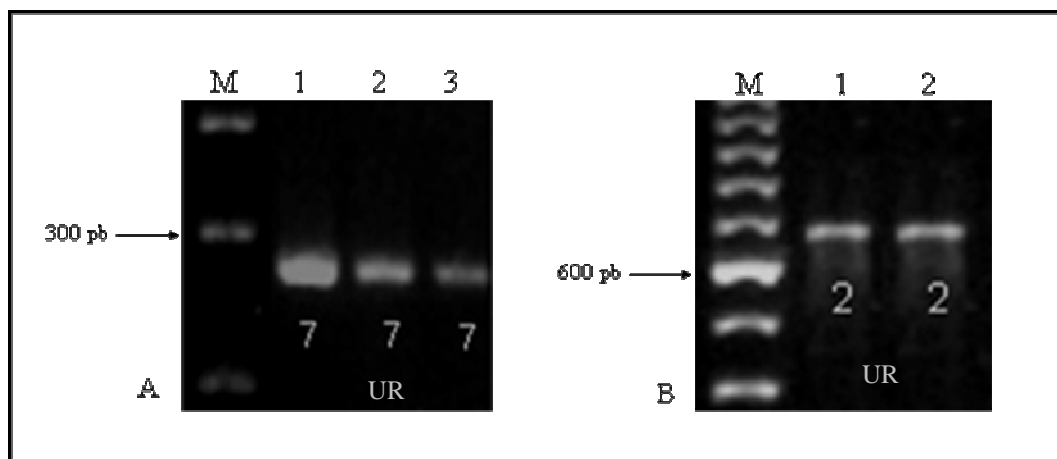


Figura 7: Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*.

Nota: (A) VNTR ms54 - Linhas: 1: PKOL, 2: P. Exu 340 e 3: Kim; (B) VNTR ms30 - Linhas: 1: P. Exu 16 e 2: P. Exu 827. M: Marcador molecular "100 pb DNA ladder". UR: Unidades Repetitivas.

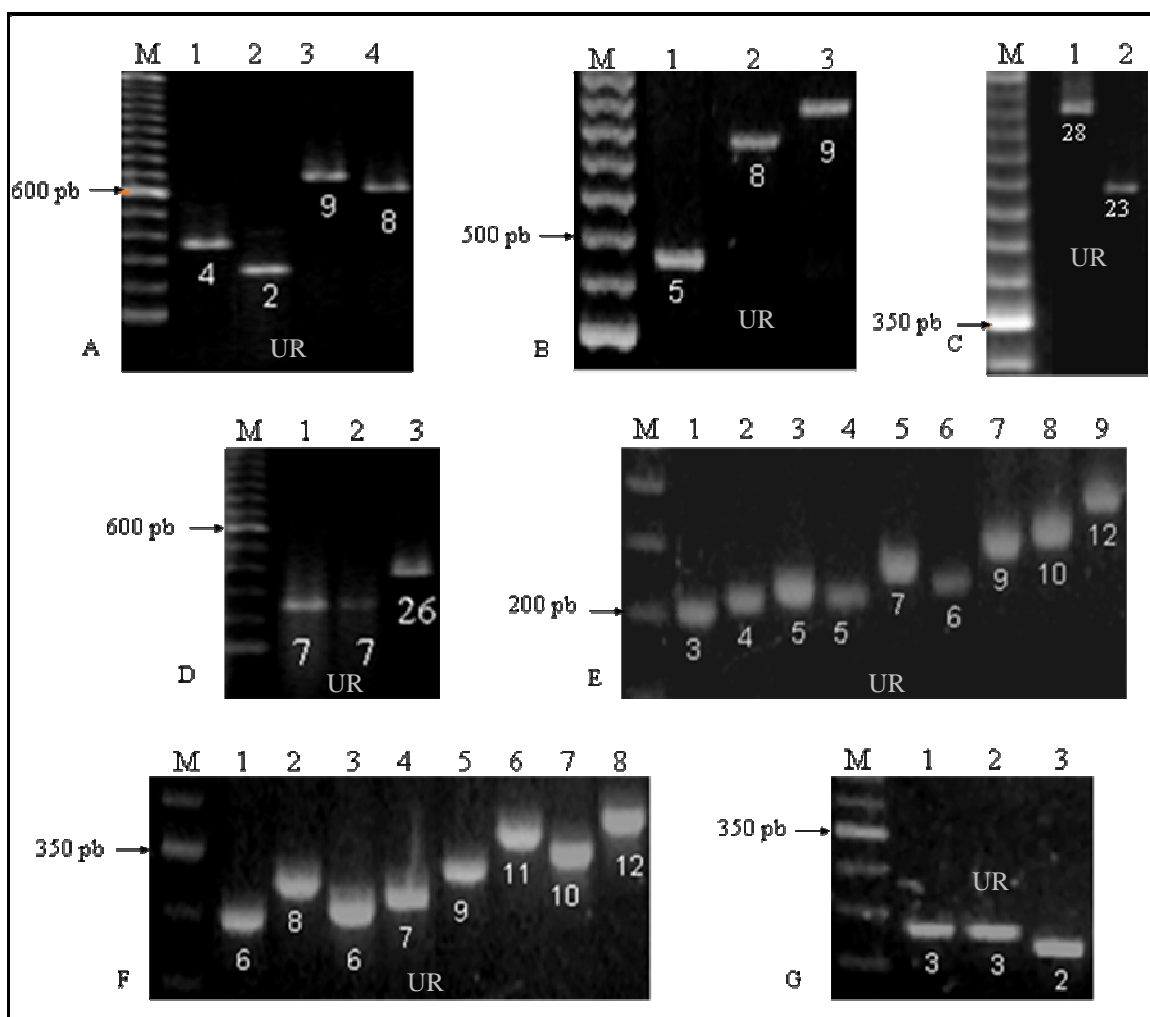


Figura 8: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*.

Nota: (A) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 16, 2: P. Exu 248, 3: P. Exu 787, 4: P. Exu 384; (B) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 387, 2: P. Exu 373, 3: P. Exu 334; (C) VNTR ms09 - Linhas: 1: P. Exu 827 e 2: P. Exu 16; (D) VNTR ms46 - Linhas: 1: P. Exu 340, 2: P. Exu 15 e 3: P. Exu 16, (E) VNTR ms62 - Linhas: 1: EV76, 2: P. Exu 827, 3: P. Exu 602, 4: P. Exu 623, 5: PKOL, 6: P. Exu 276, 7: Kim, 8: PB8 e 9: Alex; (F) VNTR ms07 - Linhas: 1: Kim, 2: P. Exu 334, 3: Kim; 4: P. Exu 16, 5: P. Exu 769, 6: P. Exu 788, 7: P. Exu 312 e 8: P. Exu 340; (G) VNTR ms45 - Linhas: 1: P. Exu 832, 2: P. Exu 827 e 3: P. Exu 16. M: Marcador molecular "50 ou 100 pb DNA ladder". UR: Unidades Repetitivas.

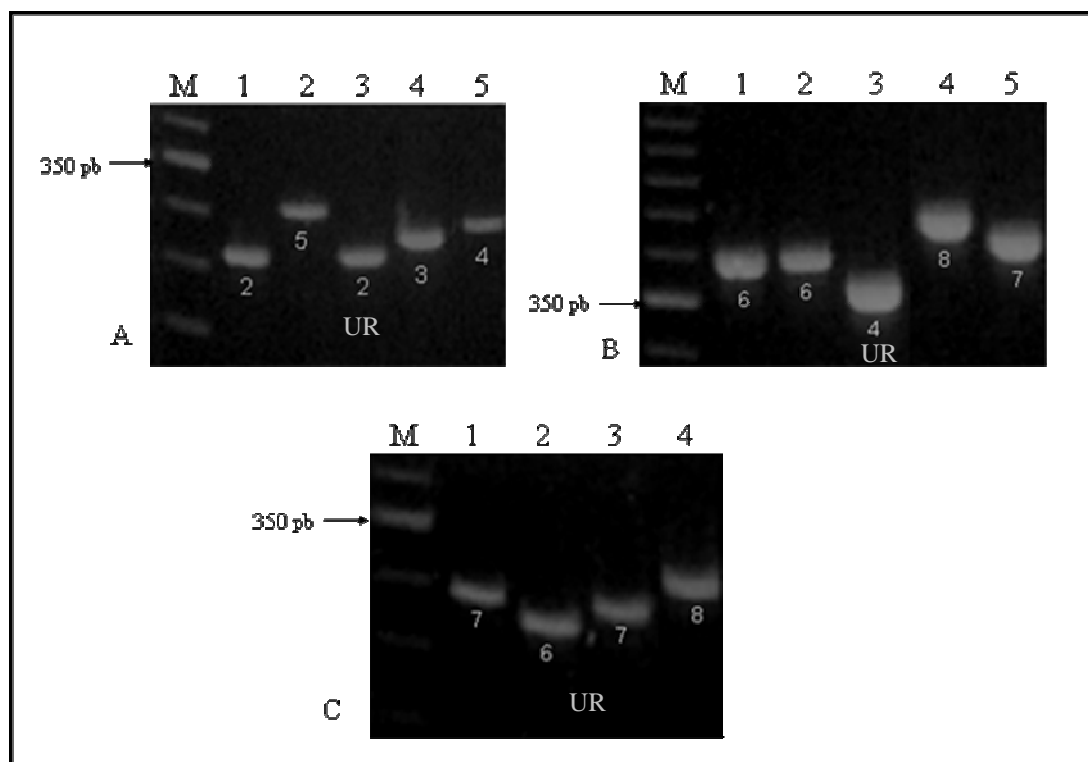


Figura 9: Gel representativo de agarose a 2,0% das ampliações por PCR dos VNTR em cepas de *Y. pestis*.

Nota: (A) VNTR ms20 - Linhas: 1: Kim, 2: P. Exu 430, 3: PKOL, 4: P. Exu 16 e 5: P. Exu 813; (B) VNTR ms04 - Linhas: 1: P. Exu 16, 2: P. Exu 715, 3: Kim, 4: P. Exu 827 e 5: P. Exu 249; (C) VNTR ms05 - Linhas: 1: P. Exu 845, 2: P. Exu 16, 3: P. Exu 798 e 4: P. Peru 375. M: Marcador molecular "50 ou 100 pb DNA ladder". UR: Unidades Repetitivas.

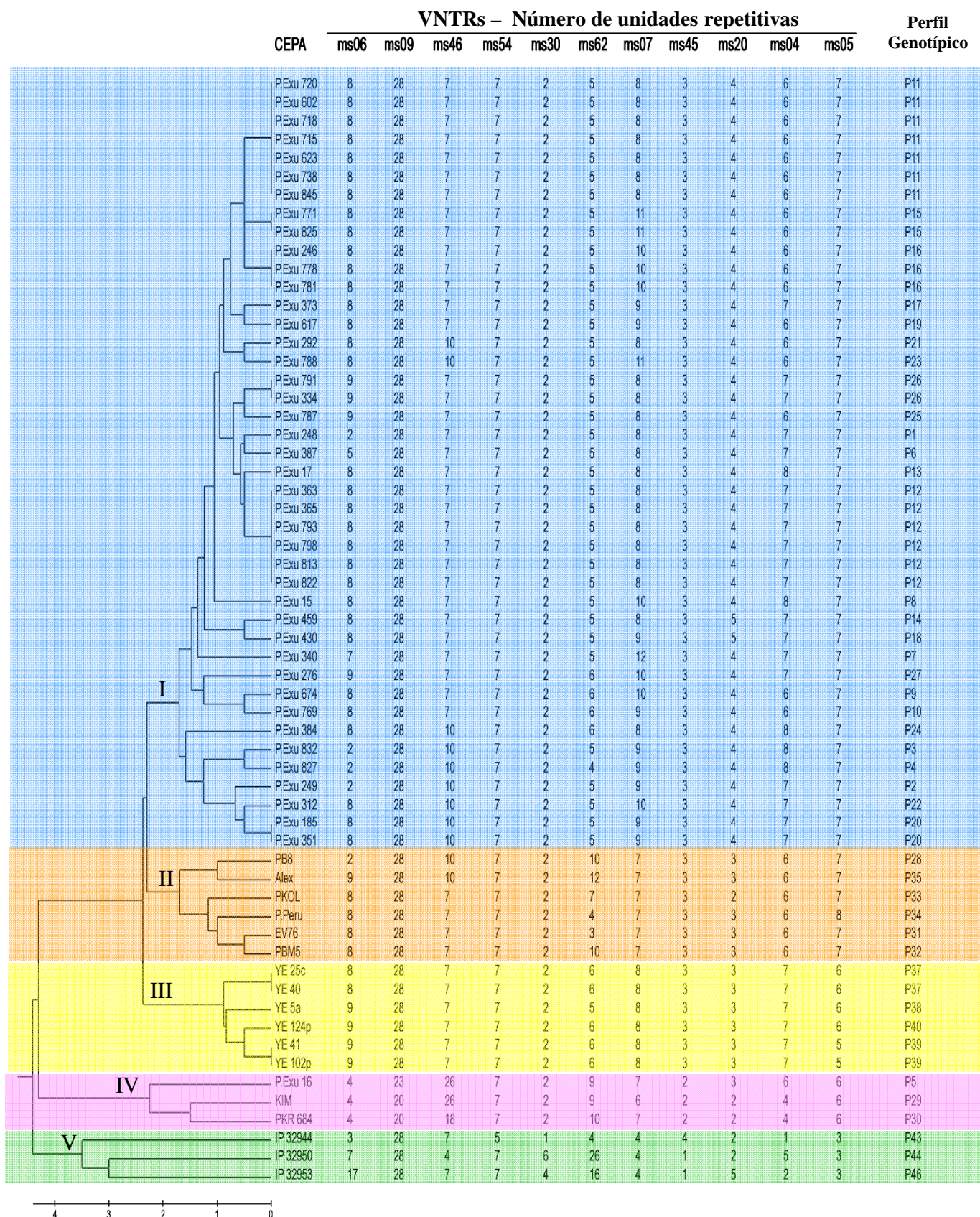


Figura 10: Dendrograma UPGMA mostrando a relação das cepas de *Yersinia* estudadas, os números de unidades repetitivas de cada cepa com os onze locos VNTRs e seus perfis genotípicos.

Nota: I – V: número de clados.

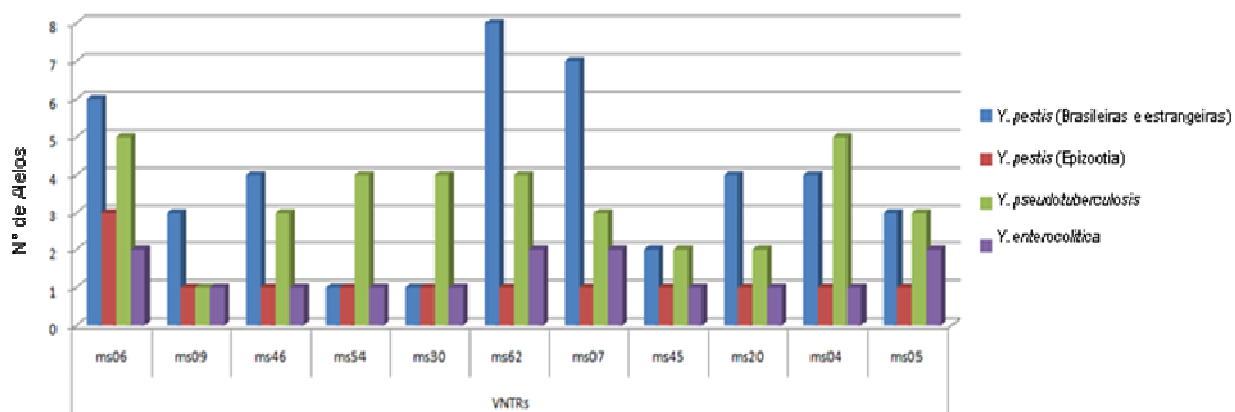


Figura 11: Gráfico de barras demonstrando a relação entre os VNTRs e o número de alelos encontrados nas diferentes espécies de *Yersinia*.

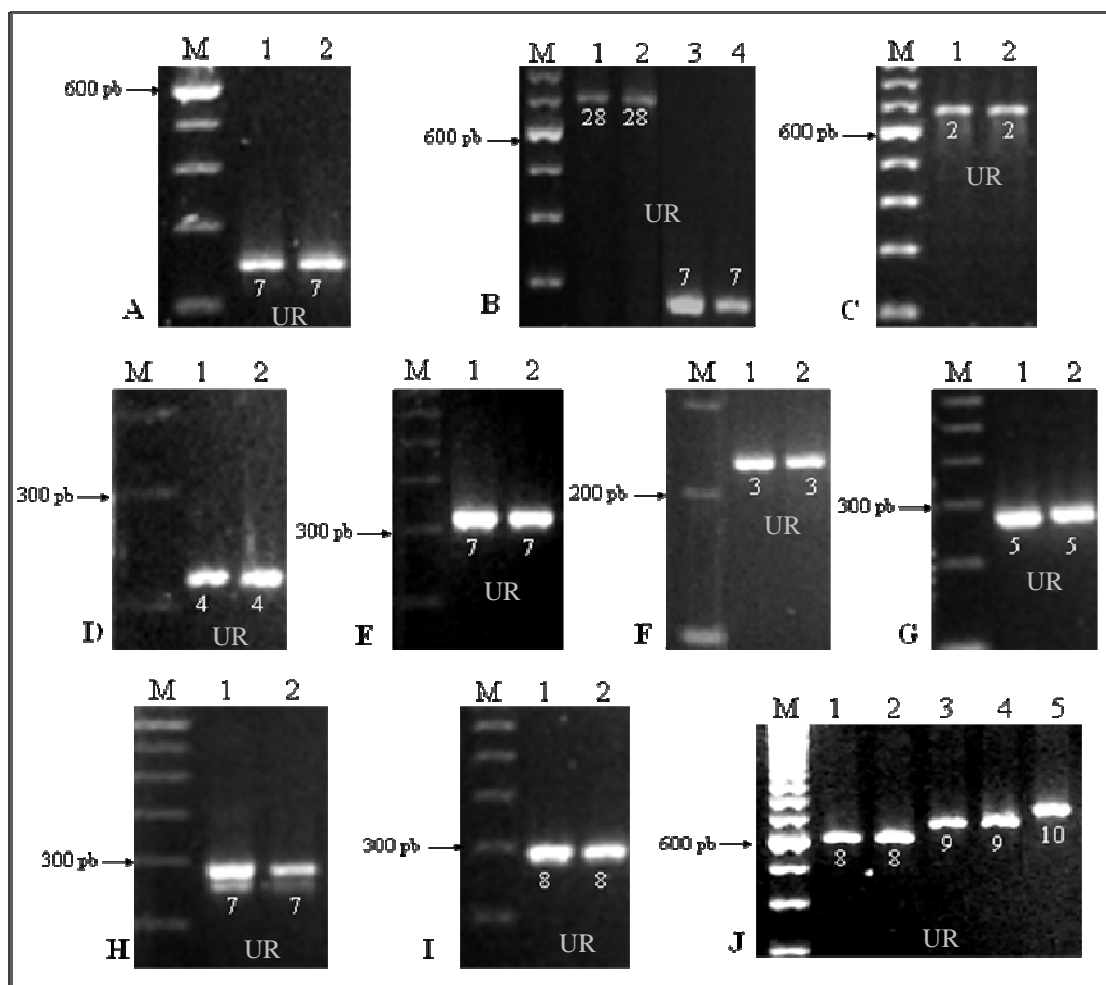


Figura 12: Gel representativo de agarose a 2,0% das amplificações por PCR dos VNTRs em culturas das cepas de *Y. pestis* isoladas durante a epizootia.

Nota: (A) VNTR ms46 - Linhas: 1: P. Exu 30 2S, 2: P. Exu 40 1S; (B) VNTRs ms09, Linhas: 1: P. Exu 47 2S, 2: P. Exu 51 1S e VNTR ms54, linhas: 3: P. Exu 39 2S e 4: P. Exu 47 2S; (C) VNTR ms30 - Linhas: 1: P. Exu 33 1Se 2: P. Exu 57 1S; (D) VNTR ms62 - Linhas: 1: P. Exu 60 2S, 2: P. Exu 31 2S; (E) VNTR ms07 - Linhas: 1: P. Exu 30 1S, 2: P. Exu 31 2S; (F) VNTR ms45 - Linhas: 1: P. Exu 57 1S, 2: P. Exu 57 2S; (G) VNTR ms20 - Linhas: 1: P. Exu 40 1S, 2: P. Exu 31 2S; (H) VNTR ms04 - Linhas: 1: P. Exu 30 1S, 2: P. Exu 31 2S; (I) VNTR ms05 - Linhas: 1: P. Exu 40 1S, 2: P. Exu 31 2S e (J) VNTR ms06 - Linhas: 1: P. Exu 47 CP, 2: P. Exu 47 CG, 3: P. Exu 54 CP, 4: P. Exu 54 CG, 5: P. Exu 59 CG. M: Marcador molecular "100 pb DNA ladder". UR: Unidades Repetitivas.

9 DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Estudos de tipagem molecular utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD, perfil plasmidial, PCR-ribotipagem) em cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstraram um baixo poder discriminatório revelando, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes, ano e local de isolamento, mostrando incoerência para sua aplicação em estudos epidemiológicos (LEAL, 1998; SOBREIRA, 2002).

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

10 CONCLUSÕES

A análise pelo MLVA revelou diversidade genética entre as cepas brasileiras de *Y. pestis* isoladas de diferentes fontes, focos e períodos com a aplicação dos onze VNTRs. A aplicação do MLVA com a combinação dos onze VNTRs aumentou o poder discriminatório da técnica;

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

O MLVA mostrou-se uma ferramenta útil em estudos filogenéticos e epidemiológicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, além de estudos intraespecíficos com as espécies de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*;

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

REFERENCIAS

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.

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. Plague surveillance in Brazil: 1983-1992. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.37, p. 511-516, 1985.

ALMEIDA, A. M. P. et al. 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.

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

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

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

BERTHERAT, E. et al. Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 1459-1462, 2007.

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

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Plague** (The United States of America). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/index.htm>>. Acesso em: 20 Fev. 2007.

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES. **Manual de Peste** (Brasil). Disponível em: < http://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/manual_pestes.pdf >. Acesso em: 7 Fev. 2007.

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

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

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

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

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

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

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

DEVIGNAT, R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. **Bulletin de l'organization Mondiale de la Santé**, Geneve, v. 4, p. 247- 263, 1951.

- DRANCOURT, M., RAOULT, D. Molecular insights into the history of plague. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p. 105-109, 2002.
- DU, Y. et al. A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1453- 1460, 2002.
- FARLOW, J. et al. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeats analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3186-3192, 2001.
- FILIPPOV, A. A. et al. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. **FEMS Microbiolgy Letters**, Amsterdam, v. 67, p. 45-48, 1990.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. (Brasil) Peste In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF, 2002. p. 641-652.
- GAGE, K. L., KOSOY, M. Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 505-528, 2005.
- GALIMAND, M. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 4, p. 677- 680, 1997.
- GIRARD, J. M. et al. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 8408 - 8413, 2004.
- GUIYOULE, A. et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, p. 43 - 48, 2001.
- HAMMING, R. Error-detecting and error-correcting codes. **Bell System Technical Journal**, Washington, v. 29, p. 147-160, 1950.
- HINNEBUSH, B. J.; PERRY, R. D.; SCHWAN, T. G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. **Science**, Washington, v. 273, p. 367 - 370, 1996.

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

HU, P. et al. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 5192-5202, 1998.

HUANG, X. Z. et al. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 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. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 283, p. 2281-2290, 2000.

JEFFREYS, A. J. et al. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, Paris, v. 314, p. 67-73, 1985.

KARIMI, Y. et al. Sur l'écologie des puces impliquées dans l'épidémiologie de la Peste et le rôle éventuel de certains insectes hématophages dans son processus au Nord-Est du Brésil. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v. 67, p. 583-591, 1974.

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.

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.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, London, v. 9, p. 299-306, 2008.

LE FLÈCHE, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. **BMC microbiology**, London, v. 1, p. 2, 2001.

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

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

LEAL, T. C. A. et al. RAPD-PCR Typing of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) O:3 Serotype strains isolated from pigs and humans. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 3, p. 315-319, 1999.

LEAL, N. C., et al. A simple PCR based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, p. 371-375, 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-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**, Ribeirao Preto, v. 99, p.727-732, 2006.

LEAL-BALBINO, T.C. et al. Peste e Tularemia. In: MARCONDES, Carlos Brizola. **Doenças transmitidas e causadas por Artrópodes**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2009. cap . 5, p. 69 – 83.

LINDLER, L. U. et al. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, p. 5731-5742, 1998.

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

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

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

LOWELL, J. L. et al. Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. **Microbiology**, New York, v. 153, p. 169 – 177, 2007.

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

MOLLARET, H. H. Le cas de la Peste. In: **Annales de démographie historique**, Paris: Mouton, 1989. p. 101-110. Cap 5.

HUMAN PLAGUE. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.55, p. 940-943, 2006.

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

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

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

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Human plague in 2004 and 2005. **Weekly epidemiological record**, v. 81, p. 273-284, 2006.

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

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

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

POLLITZER, R. History and present distribution of plague. In: **Plague. W.H.O. Monograph series-World Health Organization**, Geneva. v. 22, p. 11-45, 1954.

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

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.

SNEATH, P. H., SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, Paris, v. 193, 855-860, 1962.

SOBREIRA, M. Analisis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of diferent bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 45, p. 68, 2002.

SODEINDE, O. A., GOUGUEN, J. D. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection Immunity**, Washington, v. 56, p. 2743-2748, 1988.

SODEINDE, O. A. et al. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. **Infection Immunity**, Washington, v. 56, p. 2749-2752, 1988.

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

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

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

STENSETH, N.C. et al. **Plague: Past, Present, and Future**. PLOS Medicine (San Francisco). Disponível em:
<<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0050003>>. Acesso em: 14 set 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE – Artigo Científico**LAM – 2008 – 1326****Revised manuscript****Genetic Diversity in Brazilian Strains of *Yersinia pestis***

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

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

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

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

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

Correspondence

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

(CPqAM/Fiocruz). Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. 50670-

420. Tel: 55-81-2101.2633. Fax: 55-81-2101.2647. E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br;

tcristinaleal@yahoo.com.br

ABSTRACT

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Strains studied

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

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

Culture conditions

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

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

VNTR primers

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

DNA extraction and PCR amplification

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

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

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

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

Cluster Analysis

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

Sequencing

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

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

RESULTS

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

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

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

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

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

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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE CAPTIONS

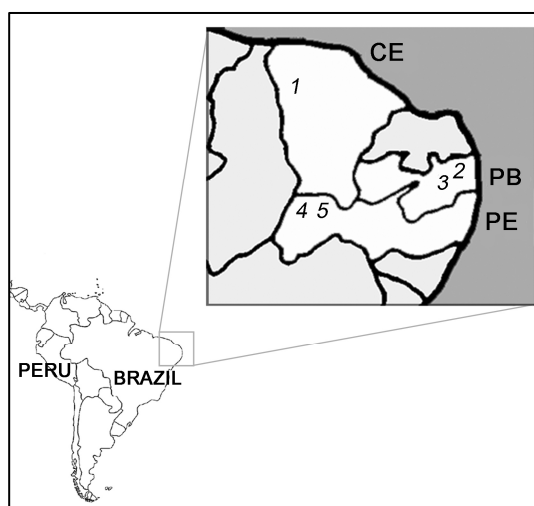


Figure 1 Geographic origin of the *Yersinia pestis* strains investigated. CE: Ceará (1: Ipu); PB: Paraíba (2: Solânea, 3: Remígio); PE: Pernambuco (4: Ipubi, 5: Exu).

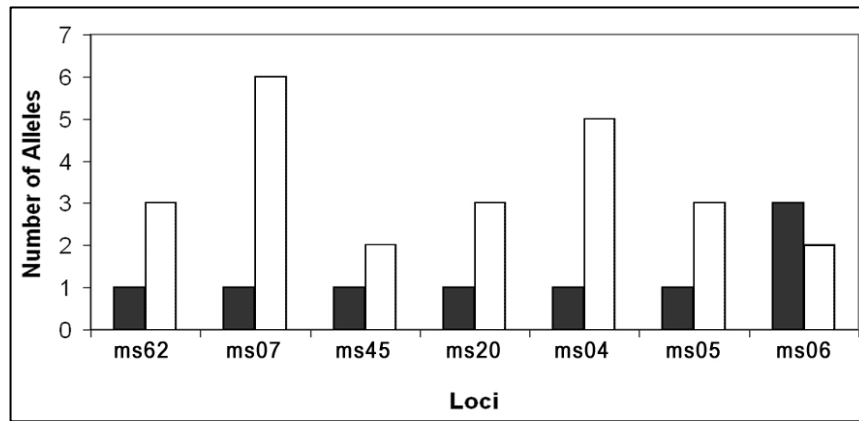


Figure 2 Distribution of the number of alleles generated in the epizootic (black bars) and outbreak (white bars) *Yersinia pestis* strains with the seven polymorphic VNTRs.

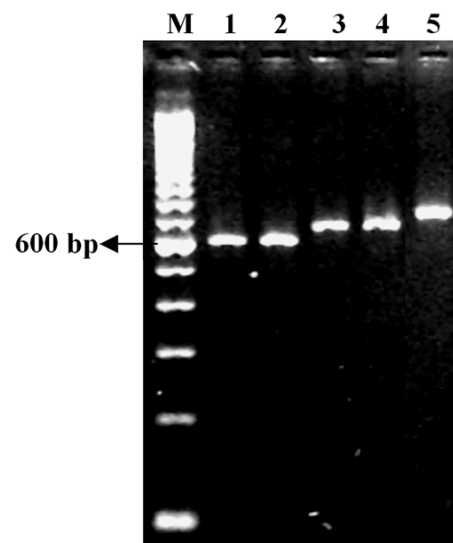


Figure 3 2.5% agarose gel electrophoresis of ms06 locus representative of the MLVA polymorphism. Lanes, M: molecular weight marker (100-bp DNA ladder); 1: P. Exu 47_{2S}; 2: P. Exu 42_{2S}; 3: P. Exu 54_{2S}; 4: P. Exu 44_{1S}; 5: P. Exu 67_{2S}.

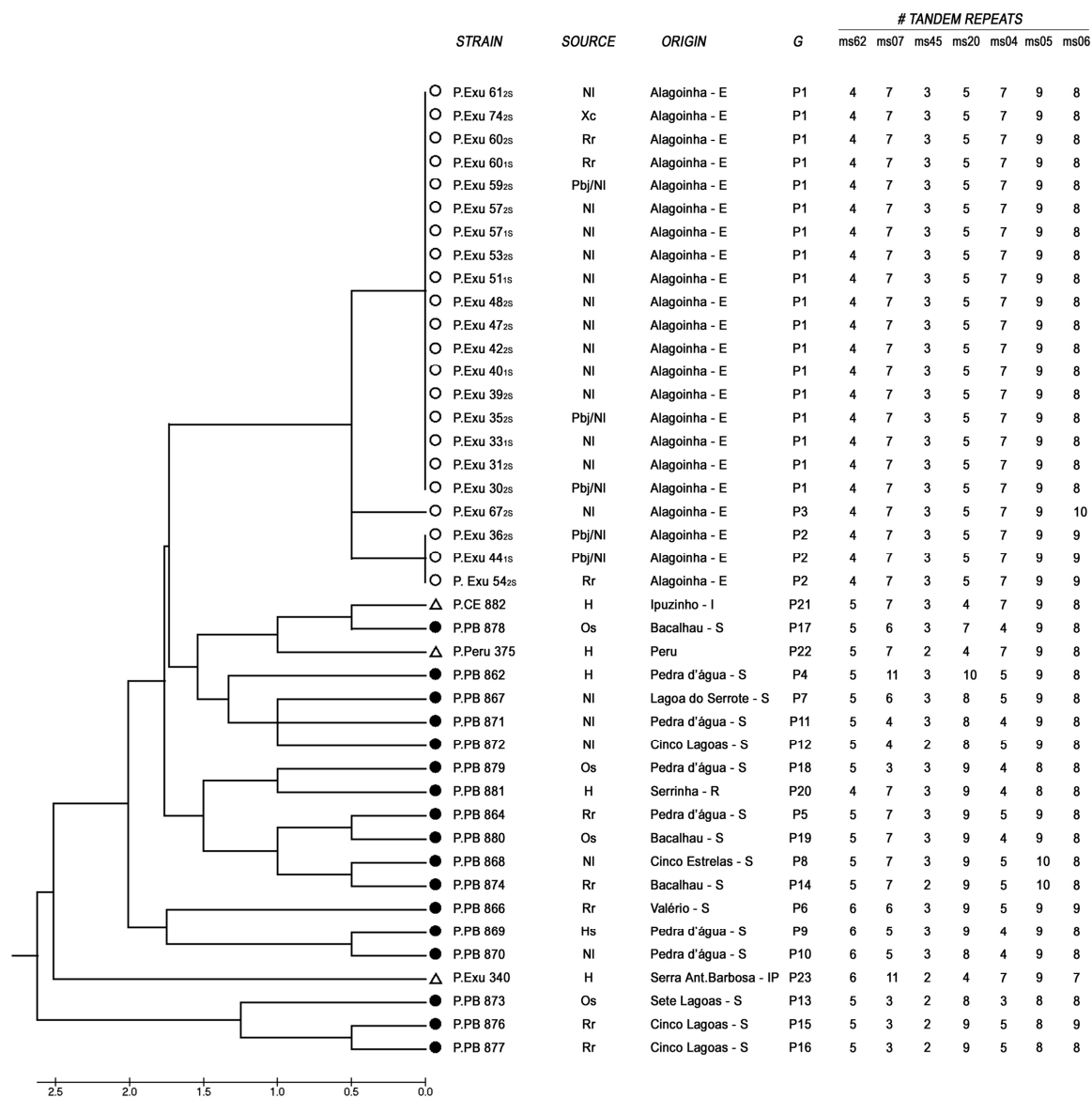


Figure 4 UPGMA dendrogram showing clustering and linkage distances of the *Yersinia pestis* strains studied their origin and distribution by genotypic groups. Abbreviations: G: genotype; H: human; Hs: *Holochilus sciureus*; NI: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus ratus*; Xc: *Xenopsylla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

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

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

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

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

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