

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Mariana de Lira Nunes

APLICAÇÃO DA TÉCNICA *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*
(LAMP) NO DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE PARA O DIAGNÓSTICO DA
PESTE

RECIFE
2013

Mariana de Lira Nunes

APLICAÇÃO DA TÉCNICA *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*
(LAMP) NO DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE PARA O DIAGNÓSTICO DA
PESTE

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

Orientadora:

Dra. Nilma Cintra Leal

Co-orientadora:

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

RECIFE
2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- N972a Nunes, Mariana de Lira.
Aplicação da técnica Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste / Mariana de Lira Nunes. - Recife: s.n, 2013.
74 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
Orientadora: Nilma Cintra Leal
Co-orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida.
1. Peste - diagnóstico. 2. *Yersinia pestis*. 3. Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico. 4. Avaliação. 1. Leal, Nilma Cintra. II. Título.

Mariana de Lira Nunes

APLICAÇÃO DA TÉCNICA *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*
(LAMP) NO DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE PARA O DIAGNÓSTICO DA
PESTE

Aprovado em: 20/03/2013

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

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. Nilma Cintra Leal
Dept. de Microbiologia - CPqAM – FIOCRUZ-PE
(Orientadora)

Dr.^a. Haiana Charifker Schindler
Dept. de Imunologia - CPqAM – FIOCRUZ-PE
(Titular)

Dr.^a. Virginia Maria Barros de Lorena
Dept. de Imunologia - CPqAM – FIOCRUZ-PE
(Titular)

Dr.^a. Zulma Maria de Medeiros
Dept. de Parasitologia - CPqAM – FIOCRUZ-PE
(Suplente)

Dr.^a. Carina Lucena Mendes Marques
Dept. de Microbiologia - CPqAM – FIOCRUZ-PE
(Suplente)

À “mainha Neide”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor e misericórdia, por nunca ter me abandonado e ter me permitido trilhar os melhores caminhos, que me trouxeram até aqui e que me levarão adiante;

À minha mãe, inspiração da minha vida, pelo seu amor incondicional e exemplo de força, determinação, dignidade, sendo a maior incentivadora e grande responsável pela realização desse sonho;

À minha irmã pela paciência e compreensão diária;

A Paulo, meu amor, amigo, confidente, companheiro de todas as horas, mesmo que fisicamente distante;

A Dra Nilma, por ter me presenteado com esse projeto incrível, pela confiança, generosidade, paciência, sendo grande exemplo a ser seguido;

A Dra. Alzira, pela co-orientação e contribuições;

A Ana Paula (Wanda) e Rodrigo Pontes (Cosmo) por sempre estarem dispostos a ajudar, por nunca deixarem de ser meus “padrinhos mágicos”;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Cláudio, Fernanda, Iara, Niedja, Silvana e, sobretudo, Fabiana Laura, pelo auxílio diário;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela estrutura disponibilizada e aos órgãos de fomento FACEPE e CNPq;

Às minhas flores, Amanda, Fernanda e Thays pela divisão de lágrimas, sorrisos, amor, raiva, decepções, vitórias, enfim, pela verdadeira amizade;

Aos companheiros de bancada, sobretudo, aos amigos de bancada: Ana Paula, Eduarda, Ewerton, Katharina, Ligia, Livia, Rodrigo Pontes e Wagner;

A todos que não foram citados, mas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização de mais essa etapa.

NUNES, Mariana de Lira. Aplicação da técnica *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

A peste, infecção causada pela bactéria *Yersinia pestis*, é uma zoonose primária de roedores, geralmente transmitida por pulgas, que infecta humanos e outros mamíferos. O diagnóstico bacteriológico tradicional da peste pode ser comprometido pela qualidade das amostras coletadas em áreas remotas, transportadas inadequadamente e recebidas no laboratório semanas após a coleta. Técnicas de diagnóstico molecular dispensam o cultivo e são exequíveis quando as bactérias estão inviáveis ou em amostras multicontaminadas. Métodos moleculares convencionais (PCR, qPCR, Nested-PCR) requerem equipamentos sofisticados para amplificação e visualização dos resultados, impedindo seu uso em laboratórios menos equipados. A amplificação isotérmica mediada por *loop* (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP), uma variação da PCR convencional, utiliza enzima que permite amplificação isotérmica, apresenta alta especificidade, sensibilidade, rapidez e custo reduzido, sendo utilizada na detecção de diversos patógenos. Esta técnica emprega de quatro a seis *primers* e a enzima *Bst* DNA polimerase, que além da atividade de síntese, atua abrindo a fita dupla de DNA. O resultado da amplificação é visualizado no próprio tubo, a olho nu. O objetivo deste projeto foi aplicar a técnica LAMP no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste. Foram construídos cinco *primers* específicos para amplificação do gene *caf1*, exclusivo de *Y. pestis*, utilizados em ensaios com o DNA da cepa *Y. pestis* A1122, para determinar as concentrações ótimas dos reagentes, temperatura de incubação (60°C, 63°C e 65°C) e tempo de duração da reação (15, 30, 45, 60 e 90 minutos). As reações foram incubadas em banho maria. A amplificação foi visualizada diretamente nos tubos contendo SYBR® Safe ou SYBR® Green I. Foi observado que a partir de 45 minutos de reação ocorre amplificação do gene *caf1*, nas três temperaturas testadas. Além disso, a técnica mostrou-se específica e sensível, detectando até 10 pg de DNA de *Y. pestis*.

Palavras chave: Peste, diagnóstico, *Yersinia pestis*, Técnicas de Amplificação de Ácido Nucléico, Avaliação.

NUNES, Mariana de Lira. Application of the technique Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in developing a test for the plague diagnosis. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Plague, *Yersinia pestis* infection, is a primary rodent disease, usually transmitted by fleas, which infects humans and other mammals. The bacteriological diagnosis of plague may be hampered by the quality of the samples collected in remote areas, improperly transported and arrived at the diagnosis laboratories, weeks after collection. Molecular diagnostic techniques exempt culturing and are feasible in multicontaminated samples or if bacteria no longer lives. Most of the molecular methods (PCR, qPCR, Nested PCR) uses sophisticated equipment for amplification and results observation, precluding its use in less equipped laboratories. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), a variation of conventional PCR, uses an enzyme for isothermal amplification, with high specificity, sensitivity, rapidity and low cost, and has been used for different pathogens detection. This technique employs four to six primers and *Bst* DNA polymerase enzyme and the amplification result is naked eye seen on the reaction tube. The objective of this work was to develop a LAMP-based procedure for plague diagnosis. Five specific primers were designed to amplify the *caf1* gene, specific of *Y. pestis* and were used in assays with DNA from *Y. pestis* strain A1122 to determine the optimal concentrations of reagents, temperature (60°C, 63°C and 65°C) and reaction time (15, 30, 45, 60 and 90 minutes). The reactions were performed in a water bath and the amplifications were seen directly in the tubes containing SYBR® Safe or SYBR® Green I. Detectable amplification of the *caf1* gene was attained after 45 minutes at the three temperatures tested and the technique proved specific and sensitive, being able to detect up to 10 pg of DNA.

Key-words: plague, diagnosis, *Yersinia pestis*, Nucleic acid amplification method, evaluation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguinais (C e D).....	17
Figura 2 - Ciclo epidemiológico da peste.....	21
Figura 3 - Trato digestivo de pulga não-infectada e infectada com <i>Y. pestis</i>	22
Figura 4 - Distribuição mundial da peste 2000-2009.....	23
Figura 5 - Focos naturais de peste no Brasil.....	25
Figura 6 - Bacilos de <i>Y. pestis</i> em tecido sanguíneo, corados pelo método de Wayson	26
Figura 7 - Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Y. pestis</i>	28
Figura 8 - Teste do bacteriófago para confirmação da <i>Y. pestis</i>	30
Figura 9 - Esquematização dos seis <i>primers</i> utilizados na reação de LAMP, mostrando suas posições de hibridização com o gene alvo.....	35
Figura 10 - Esquematização da etapa não cíclica de amplificação de ácidos nucleicos realizada na técnica LAMP.....	36
Figura 11 - Esquematização da etapa cíclica de amplificação de ácidos nucleicos realizada na técnica LAMP.....	37
Figura 12 - Hibridização dos <i>loop primers</i> na reação de LAMP.....	38
Figura 13 - Análise comparativa da similaridade entre a sequência do gene <i>caf1</i> obtida e outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI, pelo programa BLAST.....	53
Figura 14 - Localização dos sítios de hibridização dos <i>primers</i> desenhados.....	54
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de amplificação do gene <i>caf1</i> por PCR convencional, utilizando gradiente de temperatura entre 55 a 65°C.....	55
Figura 16 - Amplificação do gene <i>caf1</i> , utilizando DNA da cepa <i>Y. pestis</i> A1122, através da técnica de LAMP.....	56
Figura 17 - Visualização do resultado da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.....	56
Figura 18 - Visualização do resultado da técnica LAMP sob iluminação natural, após adição de SYBR® Green I.....	57

Figura 19 - Análise da temperatura de amplificação da técnica LAMP.....	57
Figura 20 - Visualização do resultado da análise da temperatura de amplificação da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.....	57
Figura 21 - Análise do tempo de amplificação da técnica LAMP.....	58
Figura 22 - Visualização do resultado da análise do tempo de amplificação da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.....	58
Figura 23 - Análise do tempo de amplificação da técnica LAMP após adição do <i>backward loop primer</i>	59
Figura 24 - Visualização do resultado da análise do tempo de amplificação da técnica LAMP após adição do <i>backward loop primer</i> , sob iluminação ultravioleta, através da adição de SYBR® Safe.....	59
Figura 25 - Teste de sensibilidade da PCR convencional.....	60
Figura 26 - Teste de sensibilidade da técnica LAMP.....	60
Figura 27 - Visualização do resultado da sensibilidade do LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.....	60
Figura 28 - Teste de especificidade da técnica LAMP.....	61
Figura 29 - Visualização do resultado da especificidade do LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.....	61
Quadro 1 - Fluxograma contendo as principais etapas metodológicas realizadas nesse estudo.....	43
Quadro 2 - <i>Primers</i> específicos desenhados para amplificação do gene <i>cafI</i> pela técnica de LAMP.....	54
Tabela 1 - Custo por reação, em reais, utilizando as técnicas LAMP e PCR convencional.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B3	<i>Backward Outer Primer</i>
BAB	<i>Blood Agar Base</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BIP	<i>Backward Internal Primer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search</i>
BLP	<i>Backward Loop Primer</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
F1	Fração antigênica 1
F3	<i>Foward Outer primer</i>
FIP	<i>Foward Internal Primer</i>
FLP	<i>Foward Loop primer</i>
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da hemaglutinação
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>
ID	Imufluorescência direta
KDC	<i>Killed Whole-Cell</i>
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
MDR	Resistente a múltiplas drogas
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
M-PCR	Multiplex-PCR
MS	Ministério da Saúde
NB3	Nível de Biossegurança 3
N-PCR	Nested-PCR
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	PCR quantitativa
RT-LAMP	<i>Reverse transcriptase LAMP</i>
SRP	Serviço de Referência em Peste
T _m	Temperatura de <i>Melting</i>
TTSS	Sistema de Secreção Tipo III
VNC	Viável mas não-cultivável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	16
2.1 Peste	16
2.2 Histórico da Peste	19
2.3 Epidemiologia da peste	20
2.4 Situação da peste no mundo	23
2.5 Situação da peste no Brasil	24
2.6 Agente etiológico	25
2.7 Aspectos genéticos da <i>Yersinia pestis</i>	27
2.8 Diagnóstico laboratorial da peste	29
2.8.1 Diagnóstico Bacteriológico.....	29
2.8.1.1 Exame direto.....	29
2.8.1.2 <u>Imunofluorescência direta</u>	29
2.8.1.3 <u>Cultura bacteriana</u>	30
2.8.3.2 <u>Teste rápido para identificação da <i>Yersinia pestis</i></u>	30
2.8.2 Diagnóstico Sorológico.....	31
2.8.3 Diagnóstico Molecular.....	31
2.8.3.1 <u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	31
2.8.3.2 <u>Multiplex-PCR</u>	32
2.8.3.3 <u>Nested-PCR</u>	33
2.8.3.4 <u>PCR em tempo real</u>	33
2.9 <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>	34
3 JUSTIFICATIVA	39
4 PERGUNTA CONDUTORA	40
5 HIPÓTESE	41
6 OBJETIVOS	42
6.1 Objetivo geral	42
6.2 Objetivos específicos	42
7 DESENHO DO ESTUDO	43
8 METODOLOGIA	44
8.1 Cepas bacterianas	44
8.2 Condições de cultivo	44
8.3 Extração de DNA	45
8.4 Desenho dos <i>primers</i> para amplificação do gene <i>caf1</i> pela técnica LAMP	45
8.4.1 Amplificação do gene <i>caf1</i> por reação em cadeia da polimerase.....	45
8.4.2 Sequenciamento do produto de amplificação do gene <i>caf1</i>	46
8.4.3 Desenho dos <i>primers</i> internos, externos e <i>loop primers</i>	47
8.4.4 Análise da especificidade dos <i>primers</i> externos.....	47
8.4.4.1 <u>Reação de PCR convencional</u>	47
8.4.4.2 <u>Sequenciamento do produto de amplificação do gene <i>caf1</i></u>	47

8.4.5 Determinação da temperatura de hibridização dos <i>primers</i> externos.....	48
8.5 Padronização da técnica LAMP aplicada à amplificação do gene <i>caf1</i>.....	48
8.5.1 Análise das condições de reação e concentração dos reagentes.....	48
8.5.2 Avaliação do desempenho dos <i>primers</i> internos purificados por HPLC e dessalinizados na amplificação do gene <i>caf1</i> pela técnica LAMP.....	49
8.5.3 Visualização do resultado das reações LAMP a olho nu.....	50
8.5.4 Determinação da temperatura da reação LAMP.....	50
8.5.5 Determinação do tempo de duração da reação LAMP.....	50
8.6 Avaliação da sensibilidade da técnica LAMP.....	51
8.7 Avaliação da especificidade da técnica LAMP.....	51
8.8 Análise comparativa do custo das técnicas LAMP e PCR convencional.....	52
9 RESULTADOS.....	53
9.1 Desenho dos <i>primers</i> para amplificação do gene <i>caf1</i> pela técnica LAMP.....	53
9.2 Padronização da técnica LAMP aplicada à amplificação do gene <i>caf1</i>.....	55
9.3 Avaliação da sensibilidade da técnica LAMP.....	59
9.4 Avaliação da especificidade da técnica LAMP.....	60
9.5 Análise comparativa do custo das técnicas LAMP e PCR convencional.....	61
10 DISCUSSÃO.....	63
11 CONCLUSÃO.....	66
12 PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A – CARTA À COORDENAÇÃO DA PÓS-GRADUAÇÃO DO CPqAM.....	

1 INTRODUÇÃO

A peste, infecção causada pela bactéria *Yersinia pestis*, é uma doença primária de roedores, geralmente transmitida por pulgas, que pode, ocasionalmente, infectar seres humanos e outros mamíferos. A peste é considerada uma doença re-emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com aparente tendência ao aumento do número de casos e dispersão geográfica (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

Pelas suas características epidemiológicas, a peste pode gerar uma situação de emergência em saúde pública internacional e na ocorrência de casos de peste pneumônica a OMS deve ser imediatamente notificada, conforme o Regulamento Sanitário Internacional – RSI. Para cumprir as determinações do RSI é imprescindível que se disponha de métodos precisos e eficientes de diagnóstico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005).

No Brasil, a peste persiste em dois focos: o foco do Nordeste e o foco da Serra dos Órgãos. O último caso de peste humana confirmado laboratorialmente no país ocorreu em fevereiro de 2005, no estado do Ceará, após oito anos sem registro da doença, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos, mesmo em período de silêncio epidemiológico (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

O diagnóstico bacteriológico tradicional, composto por cultura bacteriana, utilizado na rotina de vigilância da peste, pode ser prejudicado por conservação e transporte inadequados das amostras. Amostras multi-contaminadas, consideradas negativas por análise da cultura, podem ser positivas para peste ao se utilizar o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), comprovando a importância do emprego de técnicas moleculares no diagnóstico da peste (MELO; ALMEIDA; LEAL, 2003). Diante disso, o Serviço de Referência em Peste (SRP) de abrangência nacional, localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - PE), vem desenvolvendo e avaliando métodos de diagnóstico molecular que possam ser utilizados na rotina e, principalmente, em situações emergenciais.

O diagnóstico molecular da peste em amostras biológicas tem como principal alvo de amplificação o gene *caf1*, já que o mesmo é exclusivamente detectado em *Y. pestis*, oferecendo especificidade requerida para as técnicas empregadas (SOUZA et al., 2007). Além disso, esse gene apresenta sequência bastante estável, dificilmente sofrendo mutação.

Muitos métodos moleculares (PCR, qPCR, Nested-PCR e PCR multiplex) foram desenvolvidos para superar os obstáculos oferecidos pelas principais técnicas utilizadas no diagnóstico clássico. Porém, apresentam várias desvantagens intrínsecas, como o

requerimento de termociclador, tempo consumido para análise pós-PCR, métodos laboriosos para detecção dos produtos de amplificação, equipamentos caros e sofisticados, sendo, muitas vezes, inviável sua implementação em laboratórios de países em desenvolvimento (PARIDA et al., 2008).

A amplificação isotérmica mediada por *loop* (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP), originalmente relatada por Notomi et al. em 2000, é uma técnica inovadora para amplificação de genes, que consiste, basicamente, na amplificação isotérmica do DNA alvo utilizando seis *primers* diferentes, sendo dois *primers* internos (FIP e BIP), dois *primers* externos (F3 e B3) e dois *loop primers* que hibridizam na volta formada (FLP e BLP), especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene alvo. A reação é processada em banho maria à temperatura constante, cerca de 65°C, pois utiliza Bst polimerase, enzima com atividade de separação de dupla fita de DNA, durante, aproximadamente, 45 minutos (PARIDA et al., 2008; SALEH; SOLIMAN; EL-MATBOULI, 2008).

Após a amplificação, o resultado pode ser observado no próprio tubo, dispensando o uso de técnicas de observação tradicionais, já que durante o processo de amplificação há alteração da turbidez da amostra por formação de precipitado branco decorrente da acumulação de pirofosfato de magnésio em proporção aos produtos amplificados, sendo assim, ideal para monitoramento a olho nu. Ainda em relação à observação da reação de amplificação, o precipitado pode ser observado sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe ou sob iluminação natural, após adição SYBR® Green I (PARIDA et al., 2008).

Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, o LAMP tem aplicação potencial para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento, sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados (MORI; NOTOMI, 2009; PARIDA et al., 2008).

O método do LAMP tem sido desenvolvido em forma de kits comerciais, sendo alguns deles adotados como método oficialmente recomendado para identificação de microrganismos na rotina clínica e vigilância epidemiológica no Japão (MORI; NOTOMI, 2009). Essa técnica tem sido utilizada na detecção de diversos patógenos, incluindo bactérias e vírus. Porém, na literatura não há registros acerca da utilização dessa técnica no diagnóstico da peste.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Peste

A peste é uma doença infecciosa aguda causada pela bactéria *Yersinia pestis*. É primordialmente uma zoonose de roedores, geralmente transmitida pela picada de pulgas infectadas, e que pode, em determinadas condições epizooticas, infectar seres humanos e outros mamíferos. O homem pode ser infectado quando penetra no ecossistema dos roedores durante atividades de caça, agricultura, comércio ou lazer. Indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos são suscetíveis à peste (PERRY; FETHERSTON, 1997).

A peste humana apresenta três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica, além de outras formas mais raras, como a meningea, a cutânea primária, a faríngea, a endoftálmica e uma forma benigna ou ambulatorial, a *pestis minor* (ALMEIDA; TAVARES, 2010; BRASIL, 2010a).

A peste bubônica ocorre quando os bacilos são introduzidos através da pele pelas pulgas e são levados através da corrente sanguínea e linfática para o linfonodo mais próximo ao local da picada. No linfonodo a bactéria se multiplica, produzindo inflamação caracterizada pelo aumento de volume, rubor e dor local – o chamado bubão que dá o nome à doença: “Peste Bubônica” (Figura 1). Os bubões, extremamente dolorosos, possuem tamanho e formato (redondo, ovalar) variado, se encontram localizados, principalmente, na região ínguido-crural (70%), mas também ocorrem na região axilar (20%) e cervical (10%). Em geral, o bubão é único, raramente sendo múltiplo. A peste bubônica é a forma predominante da doença (80 a 95% dos casos) com mortalidade de 10 - 20% e tem como sintomas, além da presença do bubão, calafrios, cefaléia, febre alta, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos e dores generalizadas. O período de incubação da doença varia de dois a seis dias (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

Figura 1– Bubões pestosos (setas) nas regiões cervical (A), axilar (B) e inguinais (C e D).



Fonte: Adaptado de Brasil (2008).

A peste septicêmica, pode ser primária, adquirida através da introdução da bactéria diretamente através da conjuntiva ocular ou através de abrasões da pele por acidentes com tecidos ou materiais contaminados nos trabalhos em campo ou em laboratório, ou secundária às outras formas de peste. A peste septicêmica é caracterizada pela presença do bacilo no sangue, sem reações ganglionares visíveis, acompanhada de febre, dor de cabeça, mal estar, calafrios e distúrbios gastrointestinais. O início é fulminante, com febre elevada, prostração intensa, hipotensão arterial e hemorragias em vários órgãos, sendo letal em 30 a 50% dos casos, quando não tratada correta e prontamente (BRASIL, 2010a).

A peste pneumônica ocorre pela introdução do bacilo através da mucosa respiratória (peste pneumônica primária) ou secundariamente às outras formas da doença. A letalidade é alta, sendo a forma de mais alto grau de contágio (transmissão pessoa-a-pessoa) e alta capacidade de provocar epidemias pela formação de aerossóis (ALMEIDA; TAVARES, 2010; INGLESBY et al., 2000). Após um curto período de incubação (dois a três dias) há o desenvolvimento abrupto de sintomas, como: febre alta, calafrios, arritmias, hipotensão, náuseas, vômitos, astenia e confusão mental. Inicialmente, os sinais e sintomas pulmonares são discretos ou ausentes, posteriormente, surgem dores no tórax, respiração curta e rápida, com expectoração sanguinolenta e rica em bacilos pestosos (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

A forma meningea, bastante rara, ocorre em consequência da disseminação hematogênica do bacilo para as meninges, e está associada com febre e sinais meníngeos. Já na forma faríngea, adquirida após a inalação ou ingestão de bacilos, observa-se linfadenopatia cervical (INGLESBY et al., 2000).

Em oposição às formas graves, há um quadro clínico oligossintomático, denominado peste benigna ou *pestis minor*, caracterizada clinicamente por manifestações gerais leves, como adenopatia discreta, febre baixa e que evolui para cura espontânea (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

O tratamento da peste deve ser precoce e intensivo devido à gravidade e a rapidez da evolução da doença, visando deter a bacteremia e superar a toxemia. As chances de sobrevivência do paciente estão diretamente ligadas à precocidade da antibioticoterapia, especialmente nas formas mais graves (pneumônica, septicêmica, meningea). Durante as primeiras 48 horas do tratamento recomenda-se o isolamento do paciente a fim de minimizar o risco de propagação dos casos (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

Os aminoglicosídeos, estreptomicina e gentamicina, são as drogas de primeira escolha para o tratamento da peste e a doxiciclina uma droga de escolha alternativa. O trimetropim, sulfametoxazol ou tetraciclina são utilizados na quimioprofilaxia em indivíduos que mantiveram contato próximo com pacientes acometidos por peste pneumônica ou que cohabitam com doentes de peste bubônica (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

Embora em Madagascar e na Rússia tenham sido detectadas algumas cepas resistentes aos antibióticos de primeira escolha, utilizados no tratamento da peste, este fato ainda não interfere na terapêutica antimicrobiana. Entretanto, o surgimento e a possibilidade de propagação de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR) de *Y. pestis* representa uma grande ameaça a saúde humana e constitui motivo de preocupação (GALIMAND et al., 1997; STENSETH et al., 2008).

As primeiras vacinas desenvolvidas contra a peste eram produzidas com culturas de cepa total: uma utilizava a cepa virulenta 195/P inativada pela formalina (*formol killed vaccin*) e outra utilizava a cepa EV-76 avirulenta pela perda do fenótipo pigmentação ou deleção do loco Pgm. Apesar de proteger contra a forma bubônica da doença, estas vacinas apresentavam baixa eficácia contra a forma pneumônica, além de produzirem sérios efeitos colaterais, tendo seu uso interrompido nos Estados Unidos desde 1999 (SUN; ROLAND; CURTISS III, 2011).

Novas vacinas recombinantes contra antígenos específicos da *Y. pestis* (F1V ou rF1V e rV10) estão em fase clínica de teste (SUN; ROLAND; CURTISS III, 2011). Derbise et al. (2012) desenvolveram uma vacina oral (V674pF1) com uma cepa de *Y. pseudotuberculosis*, atenuada pela deleção da ilha de alta patogenicidade (HPI) e de dois genes (*psaA* - codifica antígeno do *pilus* e *yopK* - codifica a proteína efetora YopK do sistema de secreção do tipo

III), capaz de produzir o antígeno capsular F1, pela introdução do operon *caf*. Em testes com animais a V674pF1 confere alta proteção contra a peste pneumônica.

O uso de antibióticos e medidas de vigilância e controle reduziram significativamente a morbidade e a mortalidade associadas à peste, entretanto, esses procedimentos não permitiram sua erradicação (STENSETH et al., 2008).

A peste ainda representa uma grande ameaça devido à existência de numerosos focos naturais, re-emergência em vários países, possibilidade de rápido deslocamento de infectados e o risco de utilização do bacilo como arma biológica em ataques bioterroristas. Em vista disto, a OMS classificou a *Y. pestis* como nível 3 de Biossegurança e classe A de Bioterrorismo (INGLESBY et al., 2000).

Conforme o Regulamento Sanitário Internacional (RSI), na ocorrência de casos de peste pneumônica, a OMS deve ser imediatamente notificada, a fim de evitar uma situação de emergência de saúde pública internacional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A notificação compulsória de toda atividade pestosa é obrigatória e a vigilância permanente nos focos e locais por onde a infecção possa ser introduzida é de extrema importância. As atividades de controle devem ser desenvolvidas em todas as áreas pestíferas e, por exigência do Regulamento Sanitário Internacional, nos portos e aeroportos internacionais. Elas têm por objetivo evitar a infecção de humanos pelo controle dos focos naturais, reduzir a letalidade, impedir a ocorrência de epidemias, avaliar continuamente o risco de infecção para humanos e impedir a reintrodução da peste urbana através de portos e aeroportos (BRASIL, 2010a).

2.2 Histórico da Peste

A peste tem uma longa história na humanidade, com sua provável origem no Planalto Central Asiático, sendo responsável, em diferentes épocas, por milhões de mortes em todo o mundo. Os relatos mais antigos sobre peste datam da era Pré-cristã e estão descritos na bíblia, mais precisamente no II Livro de Samuel (GAGE; KOSOY, 2005; POLLITZER, 1954).

Na era Cristã três pandemias estão bem caracterizadas. A primeira pandemia de peste, denominada Peste de Justiniano, ocorreu durante os anos de 541 à 750 d.C; teve início no Egito, sendo disseminada pelo norte da África, Europa e países do centro e do sul do continente asiático, dizimando mais de 100 milhões de pessoas (POLLITZER, 1954).

A segunda pandemia, a temível Peste Negra, que dizimou cerca de um quarto da população europeia, teve início na Ásia, no século XIV e se espalhou por toda Europa e Norte da África, persistindo até o século XVI (POLLITZER, 1954). Apesar das controvérsias, a descoberta de material genético de *Y. pestis* em cadáveres enterrados em covas medievais, forneceu suporte para confirmar a *Y. pestis* como o agente causador da Peste Negra (RAOULT et al., 2000).

Toda devastação provocada por essa pandemia acabou por estimular grandes avanços, como, por exemplo, o advento da pesquisa clínica, de regulamentações de saúde pública, de novas políticas na medicina educacional e prática e, principalmente, a criação de hospitais que tinham por objetivo tratar pacientes e não apenas isolá-los da comunidade (PERRY; FETHERSTON, 1997).

A terceira pandemia teve início na província de Yünnan, na China, em 1855. Devido à maior facilidade de deslocamento, graças aos progressos dos meios de transporte (principalmente navios a vapor), a infecção espalhou-se rapidamente, atingindo Hong Kong em 1894 e, em menos de 50 anos, disseminou-se para África, Europa, Havaí, Japão, Índia, Oriente Médio, Filipinas e Américas (PERRY; FETHERSTON, 1997). Como consequência dessa disseminação, diversos focos naturais foram estabelecidos em regiões do mundo até então indenes (POLLITZER, 1954). A expansão desta pandemia entrou em declínio após a Segunda Guerra Mundial, devido à substituição dos antigos navios pelos novos, à prova de ratos (MOLLARET, 1989), mas na realidade a terceira pandemia ainda está em curso.

Em 1894, Alexandre Yersin isolou pela primeira vez o bacilo da peste em Hong Kong, o qual possui atualmente a denominação de *Yersinia pestis*, em sua homenagem. Em 1896, Yersin desenvolveu o primeiro anti-soro contra o microrganismo, utilizando-o para curar um paciente. Em 1898, Paul-Louis Simond descobriu o papel da pulga na transmissão da doença (POLLITZER, 1954).

2.3 Epidemiologia da peste

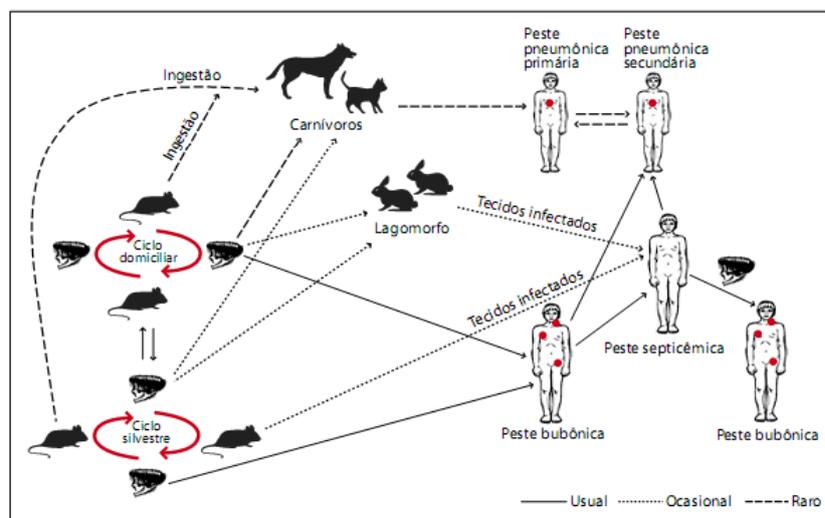
A peste é considerada uma das doenças epidêmicas mais devastadoras da história. Apresenta padrão sazonal na maioria dos países endêmicos, com distribuição geográfica bem definida, a qual se correlaciona com a predominância de roedores e sua ecologia. A peste é predominantemente rural, entretanto, surtos urbanos têm ocorrido em Madagascar e

República Unida da Tanzânia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; PERRY; FETHERSTON, 1997).

No Brasil, a ocorrência de peste humana está limitada a casos esporádicos. Entretanto, os inquéritos sorológicos das atividades de vigilância e controle nas áreas focais têm detectado anticorpos antipestosos nos animais sentinela (cães domésticos), confirmando que, apesar de sua aparente regressão, a peste permanece enraizada nos focos silvestres (TAVARES et al., 2012).

A epidemiologia da peste é complexa e pode ser descrita por quatro ciclos bioecológicos (Figura 2) (BRASIL, 2008). O ciclo enzoótico (1) ocorre entre os hospedeiros naturais moderadamente resistentes e envolve algumas espécies de roedores silvestres. O ciclo epizootico (2) inclui a transmissão do bacilo entre as espécies silvestres sensíveis. Essas espécies frequentemente morrem, conseqüentemente suas pulgas buscam outros hospedeiros, como os roedores comensais. O ciclo domiciliar ou urbano (3), pode ocorrer como consequência do ciclo epizootico. Neste, os homens e pequenos carnívoros, como cães e gatos domésticos, podem contrair a infecção por roedores silvestres infectados ou através da picada de pulgas. O ciclo pneumônico (4), caracterizado pela transmissão pessoa-a-pessoa, ocorre pela inalação de aerossóis produzidos nos casos de peste pneumônica, por acidentes com tecidos ou materiais contaminados em trabalho de campo ou laboratório, ou em decorrência de possível utilização da bactéria como arma biológica (BRASIL, 2010a).

Figura 2 – Ciclo epidemiológico da peste.

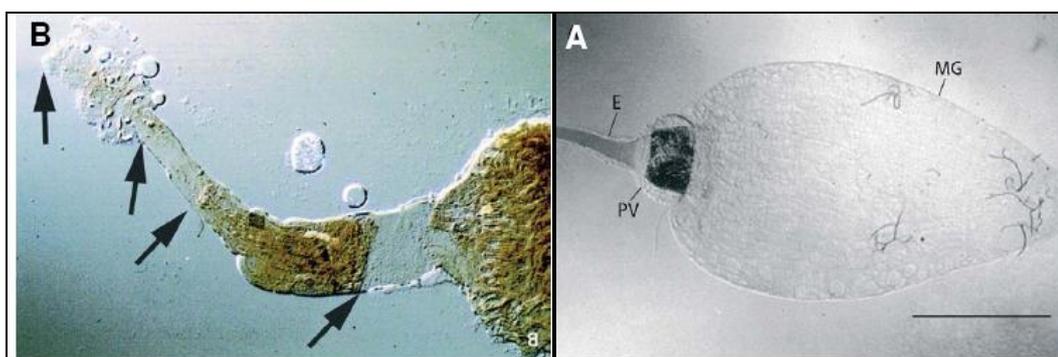


Fonte: Adaptado de BRASIL, 2008.

Das quase duas mil espécies de roedores existentes no mundo, cerca de 230 espécies podem albergar naturalmente a *Y. pestis* (BRASIL, 2010a). No Brasil, os principais roedores envolvidos no ciclo epidemiológico da peste pertencem aos gêneros: *Necromys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Galea*, *Trychomys* e *Rattus rattus* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

As pulgas participam do ciclo como vetores-reservatório do bacilo da peste, possuindo assim, papel fundamental na transmissão ao ser humano e na manutenção da *Y. pestis* nas comunidades animais. Das 1.200 espécies conhecidas, 55 são encontradas no Brasil e as espécies *Polygenis bohlsi jordani* e *Polygenis tripus* são os principais vetores da peste entre os roedores no foco do Nordeste do Brasil. A pulga *Pulex irritans*, popularmente denominada “pulga do homem”, também desempenha papel importante na transmissão pessoa a pessoa. A espécie *Xenopsylla cheopis* é “historicamente” considerada o vetor mais eficiente da peste pela sua capacidade de bloqueio do proventrículo, conseqüente à multiplicação das bactérias e formação de biofilme (Figura 3). O bloqueio do proventrículo das pulgas impede sua alimentação, deixando-as famintas, o que as estimula a picar repetidamente, infectando assim novos hospedeiros mamíferos. Durante esse processo, o sangue ingerido é regurgitado, inoculando grande quantidade de bacilos no hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 3 – Trato digestivo de pulga não-infectada e infectada com *Y. pestis*.



Fonte: Adaptado de Prentice; Rahalison (2007).

Nota: A) Trato digestivo dissecado de pulga não infectada mostrando a localização do proventrículo (PV), que conecta o esôfago (E) ao intestino médio (MG). B) Trato digestivo dissecado de pulga com PV bloqueado. As setas mostram duas matrizes incorporando agrupamentos de *Y. pestis* que se libertaram do biofilme no proventrículo.

Outro meio de contaminação, quando há lesões na pele, é através do contato ou manipulação de tecidos de animais infectados, sobretudo roedores e lagomorfos (BRASIL, 2010a). É importante ressaltar que alguns costumes também podem favorecer a infecção humana, a exemplo da ingestão de carne de camelo em países da Ásia e Oriente Médio, de

roedores na América do Sul: mocós, preás e punarés no Brasil e porquinhos-da-india nos países andinos (OLIVEIRA et al., 2011).

As aves são refratárias à infecção pela *Y. pestis* e não participam do ciclo natural da doença, no entanto, podem desempenhar um papel importante na transmissão da doença através do transporte de pulgas infectadas (STENSETH et al., 2008).

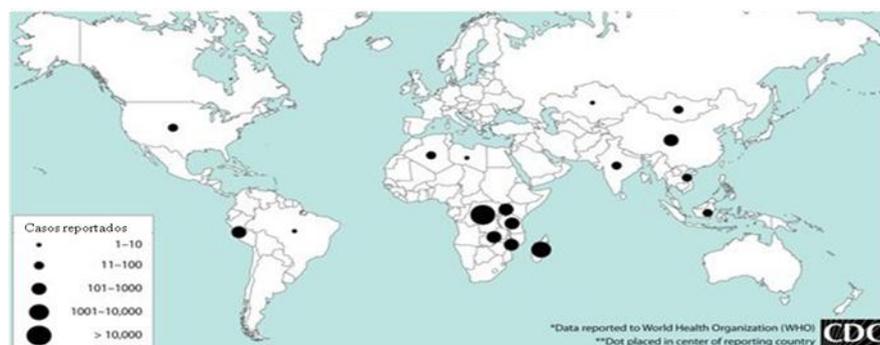
2.4 Situação da peste no mundo

Apesar de todos os casos notificados à Organização Mundial da Saúde anualmente, acredita-se que os números totais sejam sub-estimativas da situação real, em decorrência de uma vigilância inadequada e do temor do impacto que uma notificação teria sobre a economia mundial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; STENSETH et al., 2008).

A peste continua a representar uma ameaça em várias partes do mundo, apesar de muitas vezes ser vista, equivocadamente, como uma doença do passado e de reaparecimento improvável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; STENSETH et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram em média entre 1.000 a 3.000 casos de peste anualmente em todo o mundo. Períodos de silêncio, com poucos ou nenhum caso humano, podem levar à crença errônea de que a peste foi erradicada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A peste permanece na América do Norte (Estados Unidos); América do Sul (Brasil, Equador, Peru e Bolívia); África (Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia) e Ásia (China, Vietnã, Mongólia e na Ásia Central) (Figura 4) (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2009).

Figura 4 – Distribuição mundial da peste 2000 - 2009.



Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2009).

Particularmente na África, o número de casos e o número de países relatando peste têm aumentado durante as últimas décadas (NEERINCKX et al., 2010; STENSETH et al., 2008).

Entre 2004 e 2009, mais de 12.503 casos de peste humana foram reportados por 16 países localizados na África, Ásia e Américas. A média mundial de casos fatais foi de 6,7%. Os quatro países que apresentaram mais casos nesse período, foram: República Democrática do Congo, Madagascar, Peru e Estados Unidos. A África foi o continente mais atingido, oito países africanos notificaram 12.209 casos, incluindo 814 mortes, contabilizando 97,6% do número total de casos e 96,6% do número de mortes no mundo durante os anos de 2004 a 2009 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

No primeiro semestre do ano de 2012, foi confirmado um caso de peste humana no estado de Oregon nos Estados Unidos (QUINN, 2012) e em janeiro de 2013, um mercado da cidade de Trujillo, no Peru, foi interditado pela presença de pulgas infectadas.

A *Y. pestis* está entre os doze patógenos que podem se disseminar para novas regiões como resultado de mudanças climáticas, com potencial impacto para saúde humana e economias globais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

2.5 Situação da peste no Brasil

A peste chegou ao Brasil durante a terceira pandemia, em outubro de 1899, através do porto de Santos, no estado de São Paulo, e se difundiu rapidamente para outras cidades costeiras. Com as medidas de controle desencadeadas após sua introdução e o impacto do progresso, aos poucos sua incidência foi sendo reduzida nas áreas urbanas e se interiorizando nas zonas rurais a partir da década de 1930 (BRASIL, 2010a).

Após se estabelecer na zona rural, a peste ainda persiste em dois focos naturais no Brasil: o chamado “foco do Nordeste”, que se estende por vários estados do Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Piauí) e nordeste de Minas Gerais (Vale do Jequitinhonha); e o foco da Serra dos Órgãos, que abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, no Estado do Rio de Janeiro (Figura 5) (BRASIL, 2010a).

Figura 5 – Focos naturais de peste no Brasil



Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2005).

O “foco do Nordeste” foi responsável por 20 a 100 casos de peste por ano, até final da década de 1980, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará, Bahia e um importante surto na Paraíba. O foco da Serra dos Órgãos foi responsável por surtos de curta duração, tendo o último ocorrido em 1967, com oito casos humanos e duas mortes. Os últimos casos de infecção humana ocorreram no Ceará, um em 1997 e outro em 2005 (TAVARES et al., 2012).

Apesar da incidência de casos de peste humana declinar nos últimos anos nas áreas de foco, a frequência de anticorpos específicos constatada em inquéritos sorológicos realizados sistematicamente comprova a atividade na maioria deles. A persistência desses focos deve ser considerada uma ameaça real e permanente de acometimento humano, podendo determinar sérias consequências tanto no âmbito da saúde, quanto social e econômico (TAVARES et al., 2012).

O controle da peste no Brasil se deve, sobretudo, a eficiente vigilância epidemiológica realizada pelo Serviço de Referência em Peste (SRP), localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - PE), de forma contínua e ostensiva.

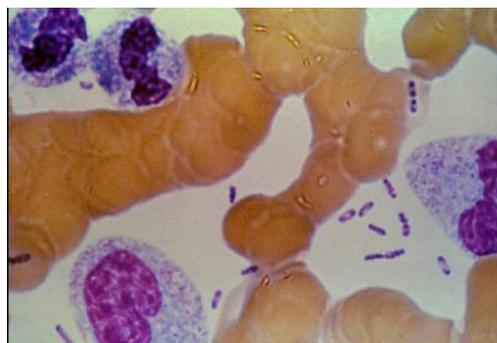
2.6 Agente etiológico

O gênero *Yersinia* (composto por 17 espécies) inclui além da *Y. pestis*, agente causador da peste, os enteropatógenos *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, e outras espécies não patogênicas (ambientais): *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*,

Y. mollaretii, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* e *Y. pekkanenii*. A espécie *Y. kristensenii* pode causar doença (enteropatógeno), principalmente em imunodeprimidos. A *Y. ruckeri* é um patógeno de peixes e sua inclusão no gênero *Yersinia* ainda é controversa (MERHEJ et al., 2008; MURROS-KONTIAINEN et al., 2011a, 2011b; PERRY; FETHERSTON, 1997; SPRAGUE et al., 2008; SULAKVELIDZE, 2000).

Microscopicamente, a *Y. pestis* tem a forma de bacilo curto, ovóide, pleomórfico, mede de 0,5 a 0,8 milímetros de diâmetro e de um a três milímetros de comprimento, é visto isolado, em aglomerados ou em pequenas cadeias. É Gram negativo e nas preparações coradas pelo Giemsa, Wright ou Wayson (Figura 6), apresenta coloração bipolar (claro no centro e extremidades escuras) (BRASIL, 2010a).

Figura 6 – Bacilos de *Y. pestis* em tecido sanguíneo, corados pelo método de Wayson.



Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2009).

É um microrganismo intracelular facultativo, aeróbio facultativo, não-fermentador de lactose, não produz indol, não hidrolisa a uréia, imóvel a 28 e 37°C, não forma esporos. A temperatura ideal de crescimento é 28°C, cresce lentamente nos meios de cultura (48 à 72 horas de incubação), suas colônias são translúcidas. A confirmação da pureza da cepa crescida em meio de cultura pode ser realizada pela ação de um fago antipestoso, determinando uma área de lise. O crescimento em caldo peptonado é floculoso e sem turvação (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Segundo Achtman et al. (1999), a *Y. pestis* é um clone derivado da *Y. pseudotuberculosis*, um patógeno entérico, que adquiriu a capacidade de infectar pulgas e utilizá-las como vetores de transmissão após a aquisição de fatores de virulência. Esse processo ocorreu provavelmente um pouco antes da primeira pandemia ocorrida na era cristã.

No meio ambiente, *Y. pestis* sobrevive por curto período de tempo fora do hospedeiro. Entretanto, sob determinadas condições, como falta de nutrientes, diminuição de temperatura,

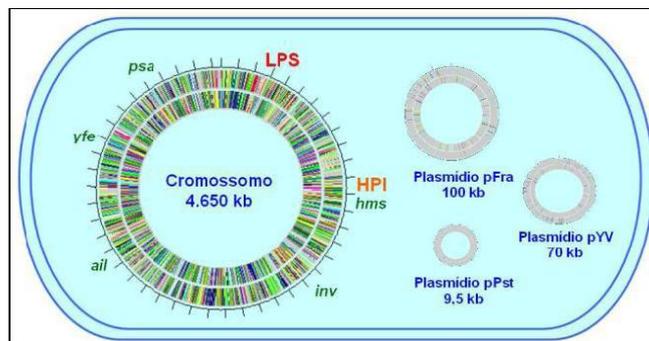
alta concentração de cloro e desequilíbrio osmótico, a bactéria é capaz de assumir estado viável mas não-cultivável (VNC), condição na qual o microrganismo é incapaz de ser cultivado em meios de cultura tradicionais, mantendo sua atividade metabólica e, na maioria dos casos, infectividade (BRENEVA; EISEN et al., 2008; MARAMOVICH; KLIMOV, 2006; MOLLARET, 1963; OLIVER, 2005; SUCHKOV et al., 1997). Esse mecanismo permite a permanência viável em materiais como escarros, fezes de pulgas e tecidos protegidos, como a medula óssea, conservando-se por longo tempo em cadáveres (ALMEIDA; TAVARES, 2010; BRASIL, 2010a).

A *Y. pestis* possui apenas um sorotipo e um fagotipo. Tradicionalmente, as cepas de *Y. pestis* foram classificadas em três biovars (*Antiqua*, *Medievalis* e *Orientalis*), caracterizados pela habilidade de fermentar glicerol e de reduzir nitratos a nitritos. O biovar *Antiqua* é glicerol positivo e nitrato positivo; o *Medievalis* é glicerol positivo e nitrato negativo e o *Orientalis* é glicerol negativo e nitrato positivo. Esses biovars não apresentam diferenças quanto à forma clínica da doença, nem à virulência. No entanto, as três variedades clássicas foram associadas a cada uma das três grandes pandemias: O biovar *Antiqua*, originalmente residente na África, foi o responsável pela “Peste de Justiniano”, o biovar *Medievalis*, original da Ásia Central, foi o responsável pela “Peste Negra”, e o biovar *Orientalis*, originado no Sudeste da China, muito difundido atualmente no mundo, é associado à peste moderna (DEVIGNAT, 1951).

Zhou et al. (2004) a partir de estudos com cepas isoladas de *Microtus brandti* e *Microtus fuscus* (roedores da ordem Rodentia, família Muridae) propuseram a criação de um novo biovar, *Microtus*, composto por cepas chinesas avirulentas ao homem, que ao contrário dos três biovars clássicos, fermenta arabinose. Mais recentemente, Li et al. (2009) propuseram a criação do biovar *Intermedium*, baseados nas características bioquímicas e epidemiológicas de alguns isolados asiáticos, patogênicos ao homem, cujo hospedeiro principal é a marmota, esse biovar é caracterizado bioquimicamente por ser glicerol positivo, arabinose positivo e nitrato positivo.

2.7 Aspectos genéticos da *Yersinia pestis*

O genoma da *Y. pestis* é formado por um cromossomo de aproximadamente 4.650 kb e três plasmídeos: pYV ou pCD1, pPst ou pCP1 e pFra ou pMT1, como esquematizado na figura 7 (DENG et al., 2002; PARKHILL et al., 2001; SONG et al., 2004).

Figura 7 – Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Y. pestis*.

Fonte: Adaptado de Leal–Balbino (2004).

O plasmídeo pYV ou pCD1, comum a *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, codifica o sistema de secreção tipo III (TTSS), o conjunto de proteínas Yops e o antígeno V, que são expressos quando o crescimento bacteriano é restrito a baixas concentrações de cálcio a 37°C (CORNELIS, 2000).

O plasmídeo pPst ou pCP1, específico de *Y. pestis*, tem importância na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro, a partir do sítio da picada da pulga e no bloqueio do trato digestivo das pulgas (HINNEBUSCH et al., 1996; 2003; SODEINDE; GOGUEM, 1988).

O plasmídeo pFra ou pMT1, específico de *Y. pestis*, é de fundamental importância para a sobrevivência da *Y. pestis* no organismo do inseto ou do mamífero. O gene *caf1*, localizado no plasmídeo pFra, codifica um polipeptídeo capsular (antígeno F1), que é exportado para a superfície da célula, onde forma a cápsula fibrilar (ZAVIALOV et al., 2003). A F1 é uma glicoproteína com atividade antifagocítica e altamente imunogênica para os mamíferos, sendo, por isso, a maioria dos testes de diagnóstico baseados na detecção de anticorpos anti-F1, do antígeno F1 ou do gene estrutural das sub-unidades da F1, o *caf1* (ANISIMOV; LINDLER; PIER, 2004; DU et al. 2002; HINNEBUSCH et al. 2002). Além disso, o pFra codifica a toxina murina, também denominada fosfolipase D, envolvida no processo de colonização do tubo digestivo das pulgas (HINNEBUSCH et al., 2002).

Além dos três plasmídeos típicos, algumas cepas de *Y. pestis* apresentam perfil plasmidial atípico, geralmente resultado da deleção, multimerização ou recombinação dos três plasmídeos (LEAL; ALMEIDA, 1999; PERRY; FETHERSTON, 1997; SONG et al., 2004).

2.8 Diagnóstico laboratorial da peste

O diagnóstico laboratorial consiste no isolamento e identificação da bactéria por técnicas bacteriológicas, detecção de anticorpos antipestosos por técnicas sorológicas e detecção de genes específicos por técnicas moleculares. Pode ser realizado em amostras de origem humana ou outros animais (hospedeiros reservatórios) ou insetos (vetores) (BRASIL, 2010a).

A *Y. pestis* é um patógeno de classe de risco 3, que requer instalações especiais para o seu manuseio, laboratório de contenção nível 3 (NB3) e profissionais capacitados quanto as normas de biossegurança (BRASIL, 2010b).

2.8.1 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico consiste no isolamento da bactéria de amostras de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano e secreção brônquica dos pacientes. A bactéria também pode ser identificada em amostras de sangue e vísceras de roedores (CHU, 2000).

2.8.1.1 Exame direto

O exame direto é realizado através da observação microscópica de esfregaços corados por diversas técnicas, como: Gram, Azul de Löffler, Giemsa e Wayson. A coloração pelo método de Wayson destaca as bactérias (coradas em azul) e as células dos tecidos (coradas em vermelho); o Azul de Löffler (azul de metileno) ressalta o aspecto bipolar da bactéria (BRASIL, 2010a).

2.8.1.2 Imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta (ID) é uma reação antígeno-anticorpo, baseada na detecção da proteína capsular F1 de *Y. pestis* em esfregaços de cultura e material de origem humana ou animal (antígeno), empregando anticorpos conjugados com material fluorescente, como o isotiocianato de fluoresceína (CHU, 2000). Essa técnica não é adotada na rotina de

diagnóstico e vigilância no Brasil, principalmente pelo fato do conjugado não ser produzido comercialmente.

2.8.1.3 Cultura bacteriana

A *Y. pestis* cresce em meios comuns de cultura, sem enriquecimento, em pH na faixa de 7,4 a 7,6 e na temperatura de 28°C. Em placas de ágar peptonado (Blood Agar Base – BAB), após 48 a 72 horas de incubação, as colônias apresentam o aspecto característico (tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante, translúcido e com bordas inteiras). A identificação é baseada na lise provocada pelo fago específico, onde três colônias com morfologia característica de *Y. pestis* são repicadas individualmente em caldo BHI e plaqueadas em meio BAB, adicionando uma gota do fago antipestoso na parte mais espessa do semeio, após o inóculo ser absorvido pelo meio de cultura. Após 24 horas de incubação a 28 °C, observa-se uma área de lise provocada pelo fago no local onde foi instilado (KARIMI et al., 1978) (Figura 8).

Figura 8 – Teste do bacteriófago para confirmação da *Y. pestis*.



Fonte: Adaptado de Brasil (2008).

O crescimento em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) ocorre em 24 a 48 horas e possui aspecto flocular sem turvação do meio (BRASIL, 2010a).

2.8.1.4 Teste rápido para identificação da *Yersinia pestis* (Fita reagente)

Chanteau et al. (2003) desenvolveram um teste imunocromatográfico tipo fita reagente que utiliza anticorpos monoclonais anti-F1 imobilizados junto a uma substância cromógena

em membranas de nitrocelulose. É de fácil e rápida execução dispensando eletricidade, equipamentos ou refrigeração das amostras. É realizado com a imersão da fita em amostras de sangue, esputo, aspirado de bubão de pacientes. A leitura do resultado é simples e é revelada por uma reação cromatográfica.

2.8.2 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico consiste na pesquisa de anticorpos contra a *Y. pestis* nos soros humanos ou dos animais envolvidos no ciclo epidemiológico da peste (CHU, 2000). No Brasil, a técnica empregada é a hemaglutinação (HA), controlada pela inibição da hemaglutinação (HI), que utiliza hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno capsular F1 (Fração antigênica 1), da *Y. pestis*. Essa técnica apresenta baixa sensibilidade, alta complexidade e seus reagentes são perecíveis (BRASIL, 2010a).

2.8.3 Diagnóstico Molecular

A utilização de técnicas moleculares para diagnóstico de peste, para o estudo, identificação e caracterização da *Y. pestis*, vem aumentando significativamente nos últimos anos. As ferramentas moleculares permitem a identificação de genes de virulência plasmidiais e cromossomais de *Y. pestis* em cepas isoladas de humanos, roedores e pulgas, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e suas variações. A utilização de métodos moleculares dispensa o cultivo de amostras, que pode apresentar resultados falso-negativos, e possibilita um diagnóstico rápido da peste, mesmo quando o material bacteriano não é viável (ALMEIDA; TAVARES, 2010).

2.8.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase, desenvolvida por Mullis e Faloona em 1987, se destaca entre os métodos moleculares. Nessa técnica, pequenas sequências de DNA ou RNA são enzimaticamente amplificadas até alcançarem concentração suficiente para serem detectadas (KONEMAN, 2001). A PCR vem sendo utilizada com grande sucesso no diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas, sendo baseada no fato de cada agente causador

de uma doença possuir sequência específica em sua composição de DNA ou RNA, pela qual pode ser identificado (ERLICH et al., 1991; KONEMAN, 2001).

A PCR consiste de três etapas fundamentais que juntas correspondem a um ciclo da reação: desnaturação da fita dupla do DNA, hibridização do par de *primers* específico e polimerização da fita de DNA em formação promovido pela enzima Taq DNA polimerase. Cada etapa é realizada a uma temperatura diferente e os ciclos ocorrem repetidas vezes. No final do processo a quantidade desejada do DNA alvo é alcançada, tornando possível sua detecção (KONEMAN, 2001).

Além da investigação em amostras recentes, a PCR é muito importante para a análise de amostras antigas. Através da PCR foi identificado material genético de *Y. pestis* em tecido coletado da polpa dentária de esqueletos de vítimas da “Peste Negra”, ocorrida entre os séculos XIV e XVI. O resultado desse estudo confirmou, apesar das especulações anteriores, que de fato a *Y. pestis* foi o agente causador dessa pandemia (RAOULT et al., 2000).

Vários protocolos baseados em PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico da peste em material humano ou animal, como: sangue, aspirado de bubão, vísceras de roedores e pulgas (LEAL et al., 1996; LEAL; ALMEIDA, 1999; LOIEZ et al., 2003; SOUZA et al., 2007), todos eles baseados na utilização de genes de virulência plasmidiais e cromossomais da *Y. pestis* como alvo para identificação e caracterização dessa bactéria.

2.8.3.2 Multiplex-PCR

A Multiplex-PCR (M-PCR) é uma variação da PCR convencional na qual são utilizados múltiplos pares de *primers* dirigidos a diferentes alvos, numa mesma reação. Assim é possível amplificar de modo simultâneo sequências-alvo de diferentes microrganismos ou mais de uma sequência-alvo de um mesmo microrganismo (KONEMAN, 2001).

A M-PCR foi padronizada para o diagnóstico de peste com *primers* direcionados aos genes: *irp2*, presente na ilha de patogenicidade cromossomal; *caf1*, *lcrV* e *pla*, presentes respectivamente nos plasmídeos pFra, pYV e pPst (LEAL; ALMEIDA, 1999). Esta técnica foi padronizada em forma de Kit com reagentes liofilizados (SILVA et al., 2012).

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). A M-PCR é importante, principalmente, para estudos epidemiológicos, pois além do diagnóstico ela permite a caracterização dos fatores de

virulência clássicos da *Y. pestis*. Essa técnica foi empregada com sucesso no diagnóstico da peste diretamente em hemocultura humana, sem prévio isolamento da bactéria ou extração de DNA e mostrou-se útil também para estudos retrospectivos (LEAL; ALMEIDA, 1999; MELO; ALMEIDA; LEAL, 2003).

2.8.3.3 Nested-PCR

A técnica Nested-PCR (N-PCR) é uma variação da PCR, sendo mais específica e sensível (ERLICH et al., 1991). É um procedimento realizado em duas etapas de amplificação: na primeira é utilizado um par de *primers* que hibridizam em uma região externa ao alvo, posteriormente, os amplicons gerados são utilizados como molde para a segunda etapa que utiliza *primers* dirigidos a uma região mais interna ao primeiro produto. A reamplificação do produto aumenta a sensibilidade da técnica, no entanto, a transferência dos amplicons para o microtubo da segunda reação aumenta o risco de contaminações cruzadas (ERLICH et al., 1991). A N-PCR foi adaptada para uso em baço de roedores sem extração prévia de DNA, tendo como alvo de amplificação o gene *cafI* (LEAL et al., 1996).

Para reduzir o risco de contaminação, as duas etapas da técnica de Nested-PCR foram adaptadas para um mesmo tubo, sendo assim denominada Nested-PCR em tubo único. Desse modo, os dois pares de *primers* são adicionados no mesmo tubo de reação (ERLICH et al., 1991; SOUZA et al., 2007). Também já foi padronizada em forma de Kit para o diagnóstico da peste com reagentes liofilizados, tendo como alvo de detecção o gene *cafI* (SILVA et al., 2012).

2.8.3.4 PCR em Tempo Real

A PCR em Tempo Real ou quantitativa (qPCR) é uma técnica derivada da PCR convencional, que permite a quantificação do produto de amplificação durante o desenvolvimento da reação (em tempo real), através do acompanhamento da fluorescência de corantes ou sondas (KUBISTA et al., 2006). No caso da utilização de corantes como o SYBR Green I, que apresenta afinidade pela fita dupla de DNA, a quantificação ocorre através do cálculo da diferença entre a fluorescência emitida quando o corante está livre (que corresponde ao basal da reação) e quando está ligado à fita dupla de DNA, sendo a emissão de fluorescência proporcional à formação dos amplicons (KUBISTA et al., 2006; ZIPPER et al., 2004). Já ao se utilizar sonda (fragmento de DNA marcado utilizado para hibridizar outra

molécula de DNA), como a TaqMan®, a mesma hibridiza na sequência alvo, sendo degradada durante o processo de amplificação devido à atividade de exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a polimerização. A separação do fluorocromo do *quencher* resulta em aumento da intensidade de fluorescência, sendo proporcional à produção de cópias do gene alvo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A qPCR requer uma plataforma de instrumentação composta por termociclador associado à leitor óptico de fluorescência e computador com software para aquisição e análise de dados obtidos durante o processamento da reação. A necessidade de conhecimento específico para análise dos dados e dependência de equipamentos e reagentes de alto custo é uma fator limitante para o uso da qPCR em rotina de grande escala (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Essa técnica foi desenvolvida para o diagnóstico da peste, utilizando genes específicos da *Y. pestis*, como por exemplo *yp48* (CHASE et al., 2005).

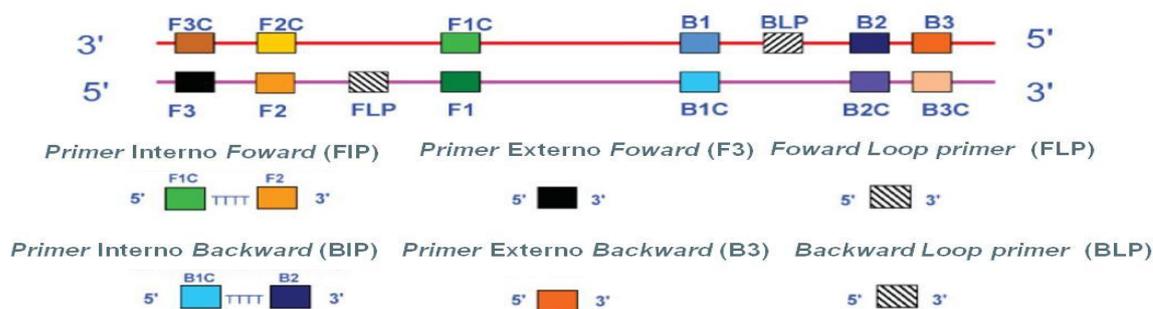
2.9 *Loop-mediated isothermal amplification*

Apesar dos métodos moleculares clássicos apresentarem diversas vantagens quanto a sua utilização no diagnóstico, em comparação às técnicas tradicionais, os mesmos são de difícil implementação na rotina laboratorial, principalmente em países em desenvolvimento, pois necessitam de equipamentos sofisticados, como termociclador, fonte de eletroforese, transiluminador, equipamento para fotodocumentação, análise pós amplificação demorada, apresentando alto custo de execução. Diante disso, a técnica molecular de amplificação isotérmica mediada por *loop* (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) constitui uma alternativa que contorna essas desvantagens (PARIDA et al., 2008).

O LAMP é caracterizado pela utilização de quatro a seis *primers* diferentes, especialmente desenhados para amplificar de seis a oito regiões distintas de uma sequência alvo de DNA ou RNA, utilizando a enzima Bst DNA polimerase, responsável pela amplificação isotérmica do gene alvo a aproximadamente 63°C, o que possibilita que a reação seja realizada em banho maria, dispensando o uso de termociclador. O tempo de reação é de, aproximadamente, 60 minutos e o resultado pode ser observado no próprio tubo, sem necessidade do emprego de eletroforese. A técnica possui variações, como RT-LAMP e LAMP multiplex (MORI; NOTOMI, 2009; TOMITA et al., 2008).

O desenho dos *primers* é uma etapa crítica para a ocorrência da reação, sendo dirigido a oito regiões distintas no gene alvo: F3c, F2c, F1c, FLP, B1, B2, B3 e BLP (Figura 9). A reação emprega dois *primers* externos - *primer* externo *foward* (F3) e *primer* externo *backward* (B3) – que atuam na separação da dupla fita de DNA, dois *primers* internos - *primer* interno *foward* (FIP) e *primer* interno *backward* (BIP) – que possuem sequência complementar a fita molde de DNA e a fita em formação, o que possibilita a formação de uma estrutura em formato de alça (o *loop*) e dois *loop primers*, facultativos na reação - *forward loop primer* (FLP) e *backward loop primer* (BLP) – que são utilizados para acelerar a reação de amplificação por hibridizarem em sítios adicionais não acessados pelos *primers* internos, sendo suas sequências complementares as sequências entre as regiões F1 e F2 (FLP); B1 e B2 (BLP) (PARIDA et al., 2008).

Figura 9 – Esquemática dos seis *primers* utilizados na reação de LAMP, mostrando suas posições de hibridização com o gene alvo.



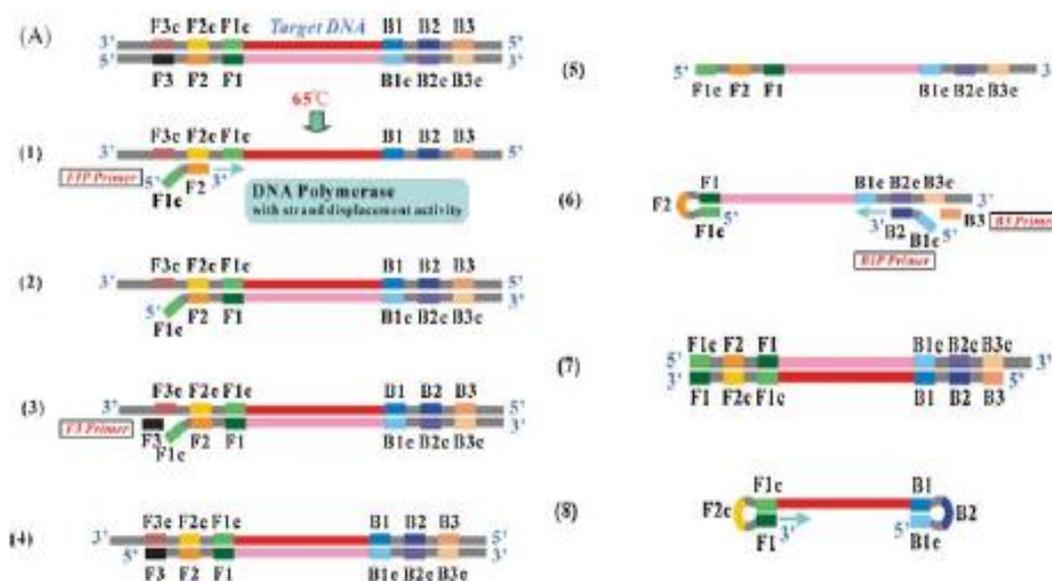
Fonte: Adaptado de Parida et al. (2008).

Para o desenho dos *primers* alguns critérios são considerados, como: a sequência dos *primers* deve conter de 40 a 60% de guanina e citosina, não devem ser formadas estruturas secundárias, o final da região 3' da sequência não deve ser rica em adenina e timina ou ser complementar a sequência dos outros *primers*, a temperatura de dissociação (T_m) deve estar compreendida entre 55 e 65°C, a estabilidade do final da sequência dos *primers*, determinada pela sua energia livre, deve ser menor do que - 4kcal/mol (PARIDA et al., 2008).

O processo de amplificação por LAMP compreende duas etapas: cíclica e não cíclica. Na etapa não cíclica (Figura 10), há formação de DNA com *loops* em cada extremidade, que serão utilizados como estrutura iniciadora para a amplificação durante a etapa cíclica. Inicialmente, a região F2 do *primer* FIP hibridiza a região F2c presente na fita molde de DNA e o processo de amplificação é iniciado pela DNA polimerase. Como o DNA se encontra em

dupla fita em condições de equilíbrio dinâmico aos 63°C, a síntese de DNA é realizada pela Bst DNA polimerase, enzima isolada do *Bacillus stearotherophilus* com atividade de abertura e liberação da fita simples de DNA (NOTOMI et al, 2000; USHIKUBO, 2004). Uma fita complementar ao DNA alvo é sintetizada, iniciando da porção 3' da região F2 do FIP. O *primer* F3 hibridiza na região F3c, externa ao FIP, no DNA alvo e inicia a separação da fita sintetizada, liberando a fita em formação. Posteriormente a fita simples de DNA liberada forma uma estrutura em formato de *loop* na extremidade 5' pela complementaridade de bases nas sequências das regiões F1 e F1c. Essa fita simples será utilizada como molde para a síntese de DNA a partir do sítio de ligação do *primer* BIP e subsequente separação da fita sintetizada pelo *primer* externo B3, semelhante ao descrito com os *primers* FIP e F3, obtendo-se uma estrutura composta por um *loop* em ambas as extremidades (PARIDA et al., 2008).

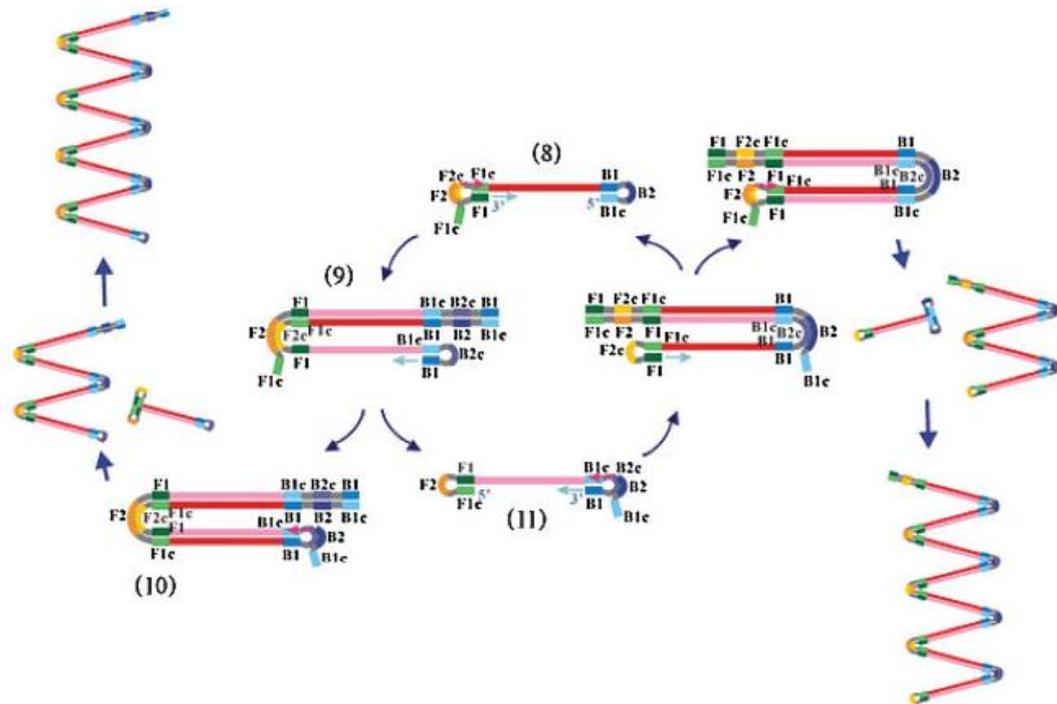
Figura 10 – Esquematisação da etapa não cíclica de amplificação de ácidos nucleicos realizada na técnica LAMP.



Fonte: Adaptado de Parida et al. (2008).

Durante a etapa cíclica da amplificação (Figura 11), ocorre amplificação exponencial das estruturas em forma de *loop*, utilizando os *primers* internos. Como resultado desse processo, estruturas de vários tamanhos consistindo de repetições alternadas invertidas da sequência alvo são formadas na mesma fita. A reação cíclica continua levando ao acúmulo de aproximadamente 10^9 cópias do gene alvo em menos de uma hora.

Figura 11 – Esquemática da etapa cíclica de amplificação de ácidos nucleicos realizada na técnica LAMP.



Fonte: Adaptado de Parida et al., 2008.

A utilização dos *loop primers* na reação é facultativa, sendo sua principal função diminuir o tempo de execução da reação de LAMP para um terço ou metade daquele observado sem a utilização desses *primers* (Figura 12). Com o uso dos *loop primers*, o processo de amplificação ocorre em, aproximadamente, 30 minutos (PARIDA et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Na vigilância epidemiológica da peste é necessário o emprego de métodos de diagnóstico rápidos, eficientes, sensíveis e específicos, visando o acionamento precoce das medidas de controle a fim de evitar a propagação da doença entre a população humana. Métodos moleculares fornecem resultados rápidos e são exequíveis mesmo quando a amostra é inadequada para provas bacteriológicas. LAMP é uma ferramenta diagnóstica simples e inovadora que pode ser empregada na rotina de laboratórios com poucos recursos, localizados em áreas rurais de países em desenvolvimento. Graças a essas características, provavelmente poderá ser utilizada em laboratórios da rede de vigilância epidemiológica da peste no Brasil e em outros países onde a vigilância se faça necessária.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A técnica LAMP apresenta bom desempenho como ferramenta diagnóstica da peste em alternativa a outros métodos moleculares?

5 HIPÓTESE

As características da técnica LAMP aplicada à amplificação de um gene específico de *Y. pestis*, o *caf1*, possibilitam a construção de um teste rápido, simples, sensível, específico, de custo reduzido para o diagnóstico da peste.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Desenvolver a técnica *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) para o diagnóstico da peste.

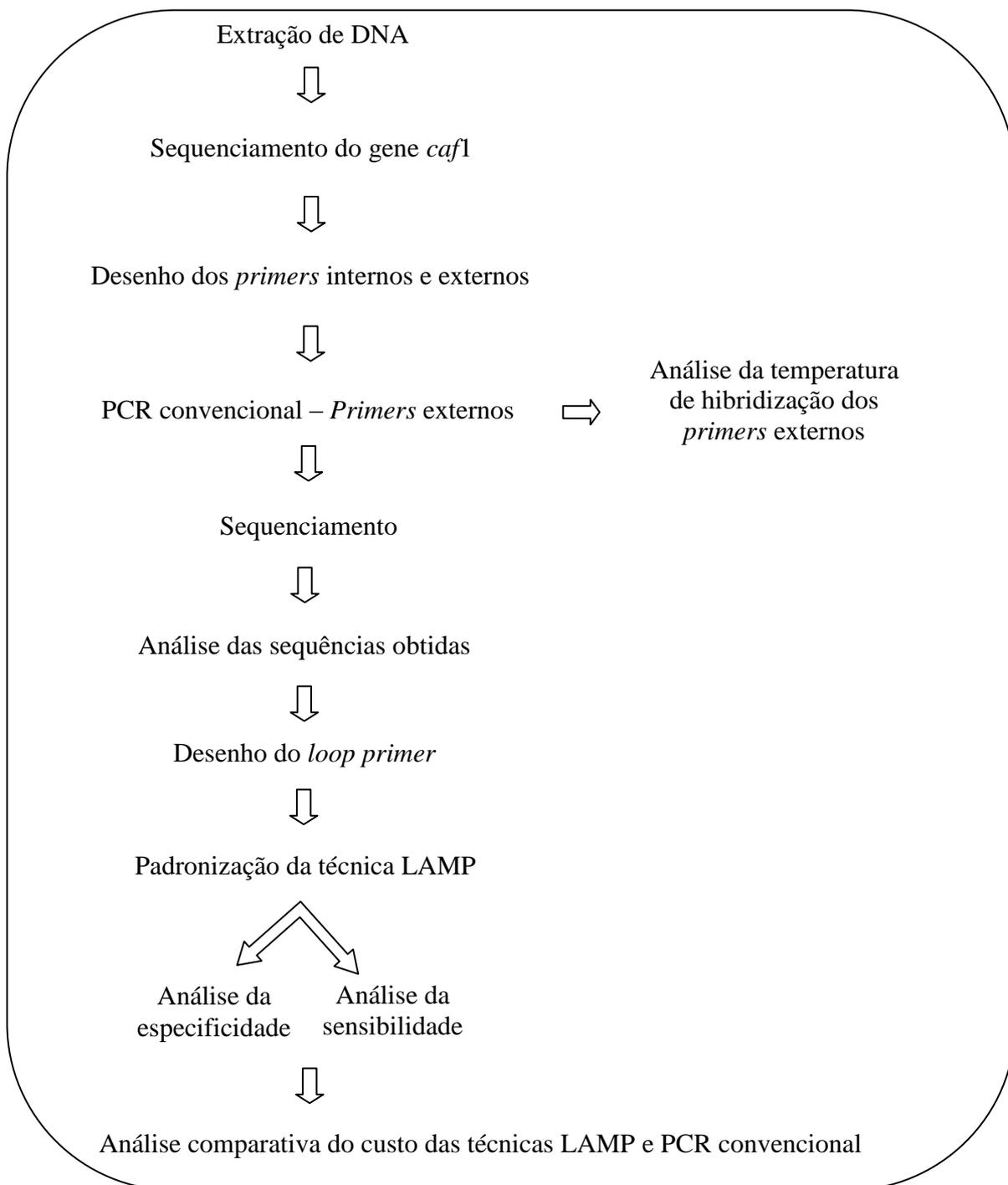
6.2 Objetivos específicos

- a) Desenhar *primers* específicos para o gene *caf1*;
- b) Padronizar a técnica LAMP aplicada à identificação de *Y. pestis*;
- c) Analisar a especificidade, sensibilidade e custo do LAMP;
- d) Analisar comparativamente o custo de cada reação LAMP e da PCR convencional.

7 DESENHO DO ESTUDO

As etapas metodológicas realizadas durante o desenvolvimento desse estudo foram sinteticamente esquematizadas no quadro 1.

Quadro 1 – Fluxograma contendo as principais etapas metodológicas realizadas nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor

8 METODOLOGIA

8.1 Cepas bacterianas

Para esse estudo foram selecionadas cinco culturas de *Y. pestis*: A1122, uma cepa de referência internacional, utilizada para a produção do antígeno F1 usado no diagnóstico sorológico da peste nos laboratórios da rede de vigilância do Ministério da Saúde (MS), P. Exu 369.1, P. Exu 390.1, P. Exu 390.2 e P. CE 882.32, originadas dos focos de peste brasileiros. Ainda foi selecionada uma cepa da espécie *Y. pseudotuberculosis* (IP 32953) e três bactérias não pertencentes ao gênero *Yersinia*: *Vibrio cholerae* 462, *Listeria monocytogenes* 226 e *Pseudomonas aeruginosa* 127.

As culturas de *Y. pestis* pertencem a Coleção FIOCRUZ-CYP, estão estocadas no NB3 da FIOCRUZ-PE, conservadas em camada alta de gelose peptonada, em câmara fria (4°C). As demais bactérias estão estocadas a -80°C em BHI com 25% de glicerol na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

8.2 Condições de cultivo

As culturas de *Y. pestis* foram reativadas por semeio em caldo BHI (Difco), incubadas a 28°C por 24 - 72 horas e plaqueadas em meio *Blood Agar Base* (BAB-Imedia). Para confirmação da pureza, três colônias de cada placa, com morfologia característica de *Y. pestis*, foram repicadas individualmente em caldo BHI, incubadas a 28°C *overnight* e submetidas ao teste rápido de sensibilidade ao fago antipestoso (KARIMI et al., 1978). A manipulação das culturas de *Y. pestis* foi realizada em laboratório NB3, seguindo as normas de biossegurança para organismos classe 3.

A cepa *Y. pseudotuberculosis* 32953 foi reativada por semeio em caldo BHI, incubada a 37°C por 24 horas e plaqueada em meio BAB. As cepas de *V. cholerae* 462, *L. monocytogenes* 226 e *P. aeruginosa* 197 foram reativadas em caldo BHI, incubadas a 37°C durante 24 horas e plaqueadas em meio Ágar Sangue. Colônias de cada cultura foram repicadas em meio BHI para extração do DNA total.

8.3. Extração de DNA

A extração do DNA total das cepas de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* 32953, *V. cholerae* 462, *L. monocytogenes* 226 e *P. aeruginosa* 127 foi realizada através do protocolo descrito por Ausubel et al. (1987). Os procedimentos para extração do DNA da *Y. pestis* foram realizados em laboratório NB3, com todos os equipamentos de segurança necessários.

Um mililitro da cultura bacteriana crescida em BHI foi centrifugado a 26.292,2g a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA). Em seguida foram adicionados 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) e 10µL de lisozima (10mg/mL), sendo a suspensão incubada a 60°C por 20 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 µL de STE (SDS 2,5%; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,25 M), seguido de incubação a 60°C por 15 minutos. Após a permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi incubada em gelo por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 130 µL de acetato de amônio 7,5 M, sendo a reação mantida no gelo por 5 minutos e em seguida centrifugada a 26.292,2 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado o mesmo volume de fenolclorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguindo-se de nova centrifugação a 26.292,2 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo o DNA precipitado com 420 µL de isopropanol e incubado a -80°C por 30 minutos, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA foi seco a vácuo e ressuscitado em 10 µL de RNase 0,02%. A quantificação foi realizada utilizando o equipamento NanoDropTM (Thermo Scientific).

8.4. Desenho dos *primers* para amplificação do gene *caf1* pela técnica LAMP

8.4.1 Amplificação do gene *caf1* por reação em cadeia da polimerase

O DNA extraído das culturas de *Y. pestis* A1122, P. Exu 369.1, P. Exu 390.2 e P. CE 882.32 foi utilizado para amplificação do gene *caf1* (513 pares de base). As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada *primer* F1F (CAGGGATCCATGAAAAAATCAGTTC) e F1R (GGGCTCGAGTTGGTTAGATACGGTTA); 20 ng de DNA molde; 1 U de Taq DNA

polimerase. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde.

As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra (TRIO – Thermoblock^M), programado para uma etapa inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos térmicos, sendo cada um composto por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 7 minutos a 72°C.

Uma alíquota de 5 µL do produto da amplificação, acrescida de 5 µL do Tampão de Amostra (azul de bromofenol 0,25%; glicerol 30% em água), foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% com 10µL de SYBR® Safe (Invitrogen). A migração foi efetuada em tampão TBE 0,5% em temperatura ambiente a 100 V e 150 mA (Fonte de eletroforese Loccus Biotecnologia), por uma hora. Após a migração, o gel de agarose foi observado em transiluminador ultravioleta e digitalizado em câmera digital Kodak.

8.4.2 Sequenciamento do produto de amplificação do gene *cafI*

Uma alíquota de 40 µL do produto de cada reação de amplificação do gene *cafI* das quatro culturas de *Y. pestis* foi acrescida de 4 µL de NaCl 3M e 100 µL de etanol absoluto, promovendo a precipitação do DNA após incubação *overnight* a -20°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 26.292,2 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e adicionado etanol a 70% ao precipitado obtido. Após centrifugação a 26.292,2g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, após secagem a vácuo, foi suspenso em 30µL de água milliq.

Os produtos de amplificação purificados foram sequenciados utilizando um sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) da Plataforma Tecnológica da FIOCRUZ, na subunidade CPqAM/FIOCRUZ-PE, através do método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). As sequências obtidas foram analisadas através dos programas SeqManTM e EditSeqTM (pacote de programas Lasergene®, version 4.01, DNASTAR Inc., Madison, WI), para avaliar o padrão de qualidade e montar as sequências contíguas. As sequências obtidas foram comparadas à seqüência de número de acesso: X61996.1, depositada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Foi analisada a similaridade das sequências obtidas com sequências de *Y. pestis*, depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*.

8.4.3 Desenho dos *primers* internos, externos e *loop primers*

Com base nas sequências obtidas, foram desenhados cinco *primers*: dois *primers* externos (F3, B3), dois *primers* internos (FIP, BIP) e, posteriormente, um *backward loop primer* (BLP), através do programa *Primer Explorer V4* (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.).

Para o desenho dos *primers* foram analisados fatores determinantes, como: conteúdo de Guanina – Citosina (GC), T_m (Temperatura de *Melting*), estabilidade do final da sequência dos *primers*, formação de estrutura secundária e distância entre os *primers* (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.).

Os *primers* foram sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT) e purificados por dessalinização e por *High-performance Liquid Chromatography* (HPLC).

8.4.4 Análise da especificidade dos *primers* externos

8.4.4.1 Reação de PCR convencional

A especificidade dos *primers* externos foi avaliada através de sua utilização em reação de amplificação do gene *caf1*, por PCR convencional, utilizando o DNA das culturas de *Y. pestis* P. Exu 390.1 e P. Exu 390.2 como molde. As reações foram preparadas em volume total de 25 µL por tubo, contendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada *primer*; 20 ng de DNA molde e 1 U de Taq DNA polimerase. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde.

As reações de amplificação, eletroforese, visualização e registro dos produtos foram realizadas conforme descrito no item 7.4.1.

8.4.4.2 Sequenciamento do produto de amplificação do gene *caf1*

A purificação dos produtos de reação de amplificação por PCR do gene *caf1* a partir do DNA extraído das culturas de *Y. pestis* P. Exu 390.1 e P. Exu 390.2, foi realizada

conforme descrito no item 7.4.2. Os produtos de amplificação purificados foram sequenciados conforme descrito no item 8.4.2. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas SeqManTM e EditSeqTM (pacote de programas Lasergene®, version 4.01, DNASTAR Inc., Madison, WI), para avaliar o padrão de qualidade e montar as sequências contíguas. As sequências obtidas foram comparadas à sequência de número de acesso: X61996.1, depositada no banco de dados do NCBI.

Foi analisada a similaridade das sequências obtidas com sequências de *Y. pestis*, depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLAST.

8.4.5 Determinação da temperatura de hibridização dos *primers* externos

A determinação da temperatura de hibridização dos *primers* externos foi realizada por reação de PCR convencional, utilizando gradiente de temperatura (55°C a 65°C) na etapa referente à hibridização dos *primers*. As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL por tubo, contendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada *primer* externo; 20 ng de DNA da cepa P. Exu 390.2; 1 U de Taq DNA polimerase. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Eppendorf (Mastercycler-epgradient) programado para iniciar com 3 minutos a 94°C, 30 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo a 1 minuto a 94°C, 1 minuto a temperatura fixada entre 55°C e 65°C e 1 minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 7 minutos a 72°C.

A eletroforese, visualização e registro dos produtos das reações foram realizados conforme descrito no item 8.4.1.

8.5 Padronização da técnica LAMP aplicada à amplificação do gene *caf1*

8.5.1 Análise das condições de reação e concentração dos reagentes

Após os processos de extração de DNA das cepas utilizadas nesse estudo e do desenho de *primers* específicos para o gene *caf1*, foram testadas condições ideais para a realização do LAMP, já que não existe na literatura protocolo para a amplificação desse gene. Inicialmente,

a reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Parida et al. (2008). A partir dos resultados obtidos, as condições de reação (temperatura e duração) e concentração dos reagentes foram alteradas e adaptadas, de acordo com outros protocolos já descritos na literatura, a fim de obter amplificação do gene *caf1* (CHEN et al., 2011; GAO et al., 2009; LIU et al., 2011; OKADA et al., 2010; SRISUK et al., 2009; TECHATHUVANAN; DRAUGHON; D'SOUZA, 2010, TOMITA et al., 2008).

Por fim as reações foram realizadas para o volume final de 25 μ L, contendo: 40 pmol de cada *primer* interno, 10 pmol de cada *primer* externo, 20 pmol do *backward loop primer*, Tris-HCl pH 8.8 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 8 mM, KCl 10 mM, dNTP 5,6 mM, Betaine 0,8 M (Sigma), Tween 20 0.1%, 8 U Bst DNA polimerase (New England Biolabs), conservada a -20°C , e 20 ng de DNA da cepa A1122, previamente desnaturado. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas, paralelamente, em termociclador Biometra e banho maria, sob temperatura constante de 65°C .

Para visualização do resultado, uma alíquota de 5 μ L do produto da reação de amplificação por LAMP acrescida de 5 μ L do Tampão de Amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 10 μ L de SYBR® Safe. A migração foi efetuada em tampão TBE 0,5% em temperatura ambiente a 100 V e 150 mA (Fonte de eletroforese Loccus Biotecnologia), por uma hora. Após a migração, o gel de agarose foi observado em transiluminador ultravioleta e digitalizado em câmera digital Kodak.

8.5.2 Avaliação do desempenho dos *primers* internos purificados por HPLC e dessalinizados na amplificação do gene *caf1* pela técnica LAMP

A atividade dos *primers* internos, purificados por HPLC e dessalinizados, foi avaliada pela sua utilização em reação LAMP, através do protocolo padronizado descrito no item 8.5.1., utilizando DNA da cepa A1122. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas, paralelamente, em termociclador Biometra e banho maria, sob temperatura constante de 65°C .

A eletroforese, visualização e registro dos produtos das reações foram realizados conforme descrito no item 8.5.1.

8.5.3 Visualização do resultado das reações LAMP a olho nu

A visualização do resultado das reações LAMP foi realizada a olho nu pela adição de 1 µL de SYBR® Safe e 1µL de SYBR® Green I (Invitrogen™), separadamente, ambos na proporção de 1:10, diretamente ao produto de amplificação obtido através do protocolo descrito no item 8.5.1., utilizando DNA da cepa A1122. O resultado foi observado no próprio tubo de reação sob iluminação ultravioleta, onde foi adicionado o SYBR® Safe, e sob iluminação natural, onde foi adicionado o SYBR® Green I.

8.5.4 Determinação da temperatura da reação LAMP

A temperatura para realização da reação LAMP foi determinada através de ensaios individuais preparados a partir do protocolo padronizado no item 8.5.1., utilizando DNA da cepa de *Y. pestis* A1122. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas individualmente, em cada uma das temperaturas: 60°C, 63°C e 65°C, em termociclador Biometra por 90 minutos. A faixa de temperatura foi selecionada tomando-se como parâmetro a temperatura de atividade da Bst polimerase.

A visualização do resultado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e observação do próprio tubo de reação após adição de SYBR® Safe, sob iluminação ultravioleta, como descrito nos itens 8.5.1. e 8.5.3.

8.5.5 Determinação do tempo de duração da reação LAMP

Após a definição da temperatura ideal para ocorrência da reação LAMP, o tempo de duração da reação foi determinado através da realização de reações de amplificação utilizando o protocolo padronizado no item 8.5.1., com o DNA da cepa de *Y. pestis* A1122. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas em termociclador Biometra programado para temperatura constante de 65°C por 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos e 90 minutos, sendo cada reação incubada individualmente em um desses tempos fixados. Foi analisado comparativamente o tempo de duração da reação utilizando ou não o *backward loop primer*, previamente desenhado.

A visualização do resultado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e observação do próprio tubo de reação após adição de SYBR® Safe, sob iluminação ultravioleta, como descrito nos itens 8.5.1. e 8.5.3.

8.6 Avaliação da sensibilidade da técnica LAMP

Para determinar a sensibilidade do método, o DNA extraído da cepa A1122 foi diluído para as concentrações de 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg, sendo uma alíquota de cada concentração utilizada para realização de amplificação do gene *cafI* pelos métodos de PCR convencional e LAMP.

As reações de amplificação por PCR convencional, eletroforese, visualização e registro dos produtos das reações foram realizados conforme descrito no item 8.4.1. As reações de amplificação por LAMP foram preparadas através do protocolo descrito no item 8.5.1. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas, paralelamente, em termociclador Biometra e banho maria, sob temperatura constante de 65°C. A visualização do resultado das reações de LAMP foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e observação do próprio tubo de reação após adição de SYBR® Safe, sob iluminação ultravioleta, como descrito nos itens 8.5.1. e 8.5.3.

Os resultados obtidos foram comparados à sensibilidade da técnica Nested-PCR, descrita na literatura.

8.7 Avaliação da especificidade da técnica LAMP

A especificidade da técnica LAMP foi avaliada através da utilização do DNA das cepas de *Y. pestis* A1122, *Y. pseudotuberculosis* 32953, *L. monocytogenes* 226, *P. aeruginosa* 197 e *V. cholerae* 462 para a realização da amplificação do gene *cafI*. As reações de LAMP foram preparadas utilizando o protocolo padronizado no item 8.5.1. Em cada reação de amplificação, foi utilizado como controle negativo um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. As reações foram incubadas, paralelamente, em termociclador Biometra e banho maria, sob temperatura constante de 65°C.

A visualização do resultado das reações de LAMP foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e observação do próprio tubo de reação após adição de SYBR® Safe, sob iluminação ultravioleta, como descrito nos itens 8.5.1. e 8.5.3.

8.8 Análise comparativa do custo das técnicas LAMP e PCR convencional

O custo das reações pelas técnicas LAMP e PCR convencional foi estimado pelo cálculo do valor dos reagentes utilizados em cada reação. Inicialmente, o valor foi calculado em reais (R\$) e convertido para dólar (US\$) e euro (€), considerando a cotação média vigente no mês de fevereiro de 2013.

9 RESULTADOS

9.1 Desenho dos *primers* para amplificação do gene *caf1* pela técnica LAMP

O gene *caf1* foi amplificado por PCR convencional utilizando DNA das culturas de *Y. pestis* A1122, P. Exu 369.1, P. Exu 390.2 e P. CE 882.32. Os segmentos amplificados foram sequenciados e as sequências comparadas com uma sequência de referência do gene *caf1*, número de acesso: X61996.1, depositada no banco de dados do NCBI. O alinhamento das sequências mostrou 100% de identidade entre elas. Em seguida, a sequência X61996.1 foi analisada, através do programa BLAST, quanto a similaridade com outras sequências do banco de dados do NCBI, sendo encontrada alta similaridade com outras sequências do gene *caf1* (Figura 13).

Figura 13 – Análise comparativa da similaridade entre a sequência do gene *caf1* obtida e outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI, pelo programa BLAST.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
X61996.1	Y.pestis genes caf1, caf1M, caf1A and caf1R	9941	9941	100%	0.0	100%	
CP001595.1	Yersinia pestis Z176003 plasmid pMT1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
CP001591.1	Yersinia pestis D182038 plasmid pMT1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
CP001587.1	Yersinia pestis D106004 plasmid pMT1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
CP000723.1	Yersinia pestis CA88-4125 plasmid pMT1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
CP000309.1	Yersinia pestis Antiqua plasmid pMT, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
AF017045.1	Yersinia pestis biovar Microtus str. 91001 plasmid pMT1, complete se	9884	9884	100%	0.0	99%	
AF074611.1	Yersinia pestis KIM plasmid pMT-1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
AF053947.1	Yersinia pestis KIM plasmid pMT1, complete sequence	9884	9884	100%	0.0	99%	
AL117211.1	Yersinia pestis CO92 plasmid pMT1	9884	9884	100%	0.0	99%	
CP001610.1	Yersinia pestis biovar Medievalis str. Harbin 35 plasmid pMT, complet	9878	9878	100%	0.0	99%	
CP000306.1	Yersinia pestis Nepal516 plasmid pMT, complete sequence	9878	9878	100%	0.0	99%	
CP000670.1	Yersinia pestis Pestoides F plasmid MT, complete sequence	9873	9873	100%	0.0	99%	
AJ698720.1	Yersinia pestis pG8786 plasmid	9867	9867	100%	0.0	99%	
AY450847.1	Yersinia pestis strain 482 plasmid pMT1 caf1 operon, complete sequ	9566	9566	96%	0.0	99%	
AY450846.1	Yersinia pestis strain 1351 plasmid pMT1 caf1 operon, complete seq	9566	9566	96%	0.0	99%	
AY450845.1	Yersinia pestis strain EV plasmid pMT1 caf1 operon, complete sequer	9566	9566	96%	0.0	99%	
DQ772703.1	Synthetic construct Yersinia pestis clone FLH0143274.01X caf1A qer	4584	4584	46%	0.0	99%	
DQ772707.1	Synthetic construct Yersinia pestis clone FLH0143017.01X caf1R qer	1692	1692	17%	0.0	99%	
DQ772705.1	Synthetic construct Yersinia pestis clone FLH0149718.01X caf1M qer	1485	1485	14%	0.0	99%	
DQ772701.1	Synthetic construct Yersinia pestis clone FLH0143186.01X caf1 qer	946	946	9%	0.0	100%	
AF542378.1	Yersinia pestis envelope antigen F1 (caf1) gene, partial cds	937	937	9%	0.0	99%	
FJ527612.1	Synthetic construct intergenic fusion protein r-PFIE gene, partial cd	904	904	9%	0.0	100%	
AF528537.1	Yersinia pestis strain assc plasmid pMT1 F1 capsule antigen (f1) gen	881	881	8%	0.0	100%	
AF528536.1	Yersinia pestis strain pusc plasmid pMT1 F1 capsule antigen (f1) gen	881	881	8%	0.0	100%	
AF528535.1	Yersinia pestis strain suau plasmid pMT1 F1 capsule antigen (f1) gen	881	881	8%	0.0	100%	
AF528534.1	Yersinia pestis strain sull plasmid pMT1 F1 capsule antigen (f1) gene	881	881	8%	0.0	100%	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a confirmação da identidade da sequência, a mesma foi utilizada para o desenho de cinco *primers* específicos para amplificação do gene *caf1*, utilizando o método LAMP: dois *primers* externos (F3 e B3), dois *primers* internos (FIP e BIP) e um *backward loop primer* (BLP) (Quadro 2), utilizando o programa *Primer Explorer V4* disponibilizado pela empresa Eiken Chemical CO., Ltd.

Inicialmente, os *primers* internos e externos foram desenhados e, após a confirmação do desenho correto desses *primers*, através da amplificação do gene *caf1*, o *backward loop*

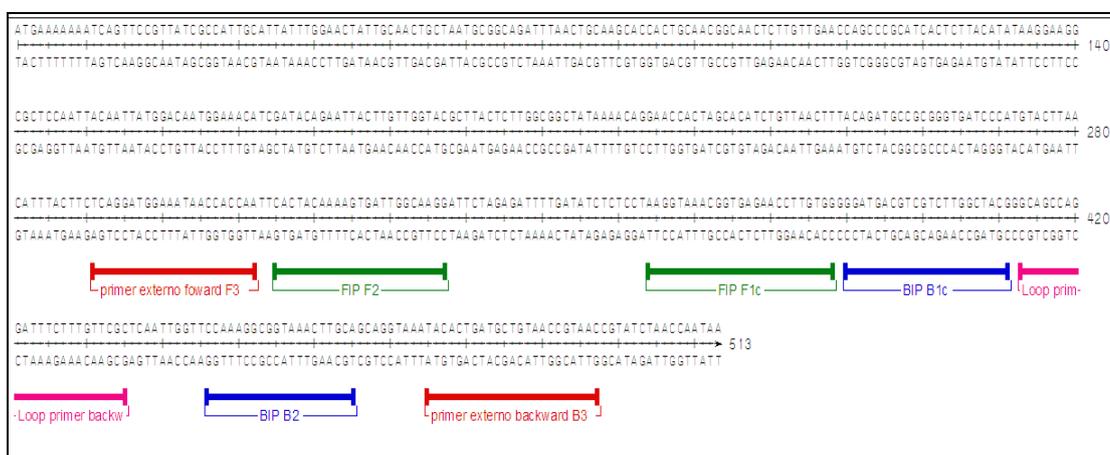
primer foi desenhado. O *forward loop primer* não pôde ser desenhado, pela impossibilidade de adequação às normas estabelecidas pelo software *Primer Explorer V4*, baseadas na sequência dos *primers* internos e externos. A localização dos sítios de hibridização dos *primers* desenhados foi analisada através do programa MapDraw (pacote de programas Lasergene®, version 4.01, DNASTAR Inc., Madison, WI) (Figura 14).

Quadro 2 – *Primers* específicos desenhados para amplificação do gene *caf1* pela técnica de LAMP.

<i>Primers</i> (descrição)	Sequências
LAMP <i>caf1</i> F3	TCAGGATGGAAATAACCACCAA
LAMP <i>caf1</i> B3	GTTACGGTTACAGCATCAGTGTA
LAMP <i>caf1</i> FIP	CCACAAGGTTCTCACCGTTTACCTTCACTACAAAAGTGATTGGCAAGG
LAMP <i>caf1</i> BIP	GGATGACGTCGTCTTGGCTACGTGCAAGTTTACCGCCTTTGG
LAMP <i>caf1</i> BLP	GCAGCCAGGATTTCTTTGTTCCG

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Localização dos sítios de hibridização dos *primers* desenhados.

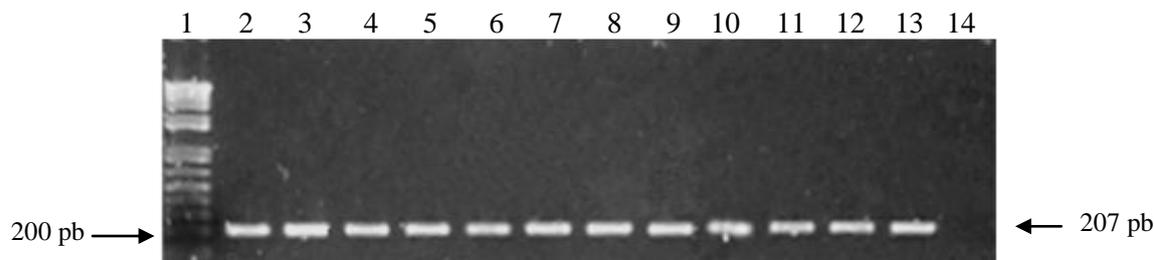


Fonte: Elaborado pelo autor.

A especificidade dos *primers* externos foi avaliada através de sua utilização em reações de PCR convencional para amplificação do gene *caf1*. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, sendo observado fragmento de tamanho esperado, 207 pares de base. A identidade do fragmento obtido foi confirmada por sequenciamento, comprovando o correto desenho dos *primers*. A temperatura de hibridização dos *primers* externos foi avaliada através de reação de PCR convencional utilizando gradiente de temperatura (55°C a 65°C) no ciclo referente ao pareamento dos *primers*. Foi possível

observar, através da eletroforese em gel de agarose, que os *primers* hibridizaram de forma semelhante em todas as temperaturas analisadas (Figura 15). Diante desse resultado, foi adotada a temperatura de 65°C, que confere maior estringência a reação.

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de amplificação do gene *cafI* por PCR convencional, utilizando gradiente de temperatura entre 55 a 65°C.



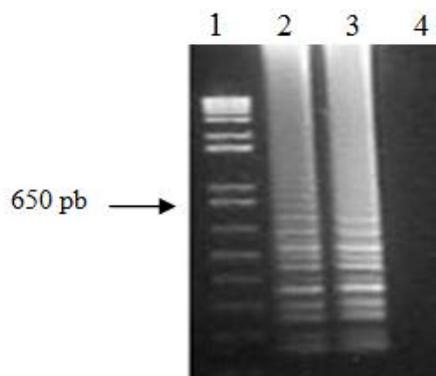
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA ladder); 2: 55°C; 3: 55,2°C; 4: 55,8°C; 5: 56,7°C; 6: 57,8°C; 7: 59,1°C; 8: 60,4°C; 9: 61,7°C; 10: 62,9°C; 11: 63,9°C; 12: 64,6°C; 13: 65°C; 14: Controle Negativo.

9.2 Padronização da técnica LAMP aplicada à amplificação do gene *cafI*

Após o desenho dos *primers* internos e externos, a reação de LAMP foi padronizada para o volume final de 25 μ L, contendo 40 pmol de cada *primer* interno, 10 pmol de cada *primer* externo, Tris-HCl pH 8.8 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM, MgSO_4 8 mM, KCl 10 mM, dNTP 5,6mM, Betaine 0,8 M, Tween 20 0.1%, 8 U Bst DNA polimerase (New England Biolabs) e 20ng de DNA molde desnaturado. A quantidade do *backward loop primer*, quando empregado na reação, é de 20 pmol. Uma constatação importante é de que a reação apenas ocorre após a desnaturação prévia do DNA a 94°C por 5 minutos. As reações foram incubadas, paralelamente, em banho maria e termociclador, sendo observado que as duas alternativas são eficientes para a amplificação do gene *cafI*.

Após o processamento da reação, utilizando DNA da cepa de *Y. pestis* A1122, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, observando-se a presença de diversas bandas de tamanhos diferentes, características da reação de LAMP (Figura 16).

Figura 16 – Amplificação do gene *caf1*, utilizando DNA da cepa *Y. pestis* A1122, através da técnica de LAMP.

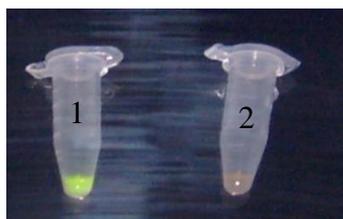
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA ladder); 2: LAMP *Y. pestis* A1122; 3: LAMP *Y. pestis* A1122; 4: Controle negativo.

Os ensaios comparando o desempenho dos *primers* internos dessalinizados e purificados pela técnica de HPLC, revelaram que as duas formas de purificação são adequadas (Dados não mostrados).

A detecção do resultado da reação de LAMP, além de ter sido realizada pela eletroforese em gel de agarose, foi testada tanto através da adição de SYBR® Safe quanto de SYBR® Green I, diretamente do produto de amplificação, sendo observado, respectivamente, sob iluminação ultravioleta e natural. Os dois compostos apresentaram a mesma sensibilidade para a detecção do resultado. Pôde-se observar que os produtos das reações positivas apresentaram coloração verde e as reações negativas não fluoresceram ou não tiveram sua coloração modificada após adição dos dois compostos cromogênicos, apresentando coloração alaranjada, característica do SYBR® Safe e do SYBR® Green I (Figuras 17 e 18). É importante destacar que, apesar de diversas tentativas, não foi possível detectar o resultado no próprio tubo, utilizando iluminação natural sem adição de composto cromogênico.

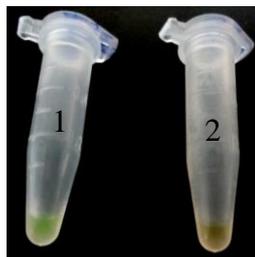
Figura 17 – Visualização do resultado da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Reação positiva; 2: Reação negativa.

Figura 18 – Visualização do resultado da técnica LAMP sob iluminação natural, após adição de SYBR® Green I.

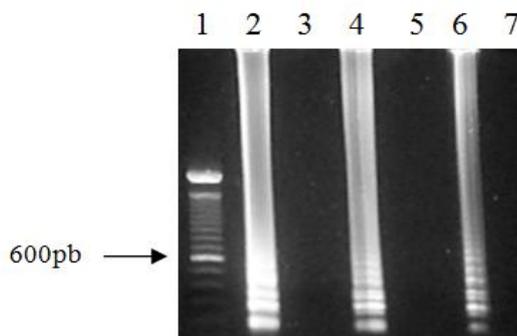


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Reação positiva; 2: Reação negativa.

Para analisar a temperatura mais eficaz para a amplificação do gene *caf1*, foram testadas as temperaturas de 60°C, 63°C e 65°C. Foi possível observar que nas três temperaturas a reação ocorreu na mesma intensidade, conforme visualizado em gel de agarose a 1% e a olho nu, pela adição de SYBR® Safe, sob iluminação ultravioleta (Figura 19 e 20).

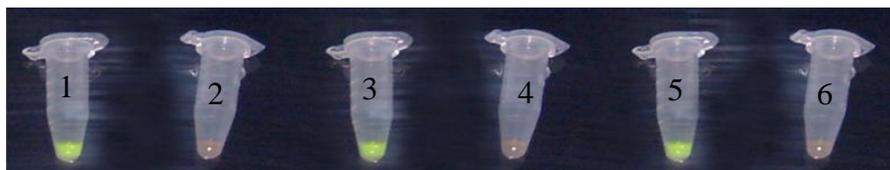
Figura 19 – Análise da temperatura de amplificação da técnica LAMP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA ladder); 2: 60°C; 3: Controle negativo; 4: 63°C; 5: Controle negativo; 6: 65°C; 7: Controle negativo.

Figura 20 – Visualização do resultado da análise da temperatura de amplificação da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.

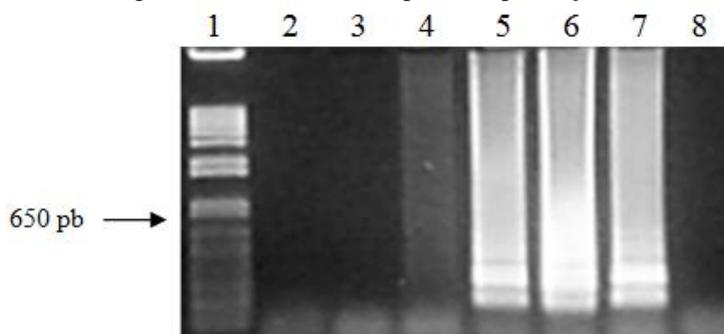


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: 60°C; 2: Controle negativo; 3: 63°C; 4: Controle negativo; 5: 65°C; 6: Controle negativo.

Nos ensaios para determinar o tempo de duração da reação LAMP, foram testados os tempos de incubação das reações de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos e 90 minutos, sendo possível observar o resultado, por eletroforese e a olho nu, a partir de 45 minutos, de forma diminuta, atingindo visibilidade ideal a partir dos 60 minutos (Figuras 21 e 22). Com a utilização do *backward loop primer* na reação de LAMP, o tempo necessário para a nítida visualização da amplificação é reduzido para 45 minutos (Figuras 23 e 24).

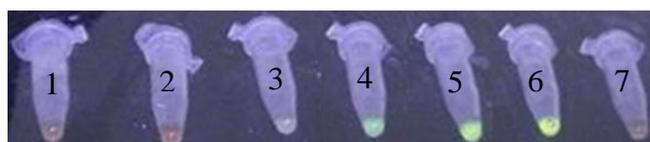
Figura 21 – Análise do tempo de amplificação da técnica LAMP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

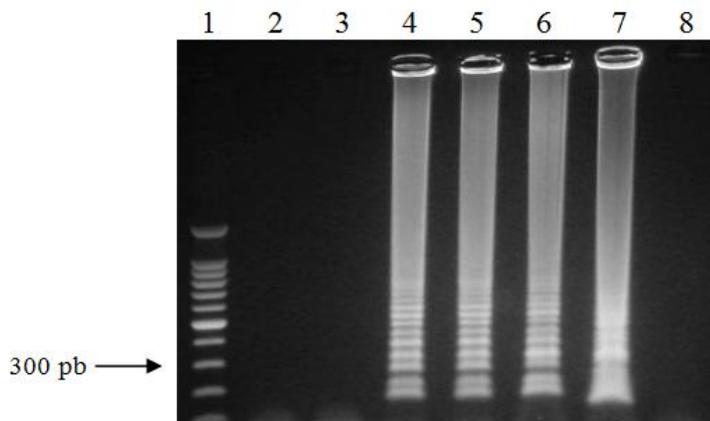
Nota: 1: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA ladder); 2: 15 minutos; 3: 30 minutos; 4: 45 minutos; 5: 60 minutos; 6: 75 minutos; 7: 90 minutos; 8: Controle negativo.

Figura 22 – Visualização do resultado da análise do tempo de amplificação da técnica LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: 15 minutos; 2: 30 minutos; 3: 45 minutos; 4: 60 minutos; 5: 75 minutos; 6: 90 minutos; 7: Controle negativo.

Figura 23 – Análise do tempo de amplificação da técnica LAMP após adição do *backward loop primer*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder); 2: 15 minutos; 3: 30 minutos; 4: 45 minutos; 5: 60 minutos; 6: 75 minutos; 7: 90 minutos; 8: Controle negativo.

Figura 24 – Visualização do resultado da análise do tempo de amplificação da técnica LAMP após adição do *backward loop primer*, sob iluminação ultravioleta, através da adição de SYBR® Safe.

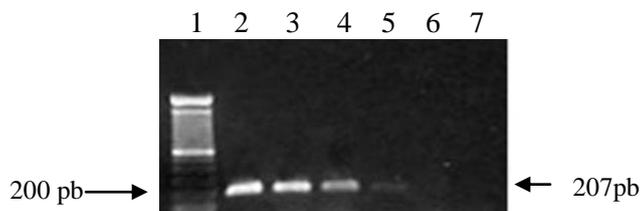
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: 15 minutos; 2: 30 minutos; 3: 45 minutos; 4: 60 minutos; 5: 75 minutos; 6: 90 minutos; 7: Controle negativo.

9.3 Avaliação da sensibilidade da técnica LAMP

Para avaliar a sensibilidade da técnica LAMP, o DNA extraído da cepa de *Y. pestis* A1122, diluído nas concentrações de 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg, foi utilizado em reações de LAMP e PCR convencional. A PCR convencional foi capaz de detectar até 10 pg de DNA (Figura 25), resultado semelhante ao observado na técnica LAMP, detectado tanto por eletroforese em gel de agarose (Figura 26), quanto por adição do SYBR® Safe nas reações (Figura 27). Em síntese, o limiar de detecção das duas técnicas foi de 10 pg de DNA.

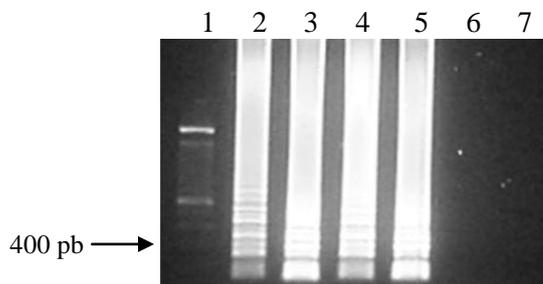
Figura 25 – Teste de sensibilidade da PCR convencional.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder); 2: 10 ng; 3: 1 ng; 4: 100 pg; 5: 10 pg; 6: 1 pg; 7: Controle negativo.

Figura 26 – Teste de sensibilidade da técnica LAMP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder); 2: 10 ng; 3: 1 ng; 4: 100 pg; 5: 10 pg; 6: 1 pg; 7: Controle negativo.

Figura 27 – Visualização do resultado da sensibilidade do LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.



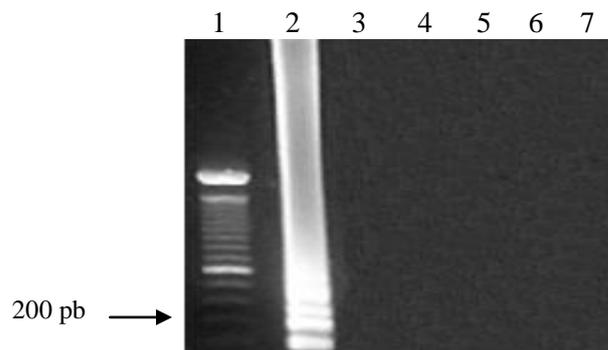
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: 10 ng (positivo); 2: 1 ng (positivo); 3: 100 pg (positivo); 4: 10 pg (positivo); 5: 1 pg (negativo); 6: Controle negativo.

9.4 Avaliação da especificidade da técnica LAMP

A especificidade da técnica LAMP foi avaliada através de ensaios utilizando DNA extraído das culturas de *Y. pestis* A1122, *Y. pseudotuberculosis* 32953, *L. monocytogenes* 226, *P. aeruginosa* 197 e *V. cholerae* 462 nas reações de amplificação. Apenas na reação obtida a partir do DNA da cepa de *Y. pestis* houve amplificação do gene *cafI*, comprovando a especificidade da técnica (Figuras 28 e 29).

Figura 28 – Teste de especificidade da técnica LAMP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder); 2: *Y. pestis* A1122; 3: *Y. pseudotuberculosis* IP 32953; 4: *L. monocytogenes* 226; 5: *P. aeruginosa* 127; 6: *V. cholerae* 462; 7: Controle negativo.

Figura 29 – Visualização do resultado da especificidade do LAMP sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: 1: *Y. pestis* A1122 2: *Y. pseudotuberculosis* IP 32953; 3: *L. monocytogenes* 226; 4: *P. aeruginosa* 127; 5: *V. cholerae* 462; 6: Controle negativo.

9.5 Análise comparativa do custo das técnicas LAMP e PCR convencional

O custo dos reagentes utilizados em cada reação de LAMP e PCR convencional foi calculado e disposto na tabela 1. Nessa estimativa não foi contabilizado o custo dos equipamentos utilizados nas reações de LAMP, apenas um banho maria, e PCR convencional, termociclador, cuba e fonte para eletroforese, transiluminador ultravioleta, aparelho de fotodocumentação e computador para armazenamento e processamento dos dados.

Tabela 1 – Custo por reação, em reais, utilizando as técnicas LAMP e PCR convencional.

LAMP		PCR convencional	
Reagente	Custo por reação (R\$)	Reagente	Custo por reação (R\$)
Bst polimerase	1,33	Taq polimerase	1,42
Sulfato de Magnésio	0,002715	Cloreto de Magnésio	0,0032
dNTP	0,003	dNTP	0,0042
<i>Primers</i>	0,3	<i>Primers</i>	0,13
Betaine	0,24	Agarose + TBE	0,57
SYBR® Green I	0,07	SYBR® Safe	0,30
Custo total por reação	R\$ 1,95	Custo total por reação	R\$ 2,45

Fonte: Elaborado pelo autor.

O custo por reação da técnica LAMP foi de R\$ 1,95, sendo convertido para dólar e euro, o valor obtido foi, respectivamente, de US\$ 0,99 ou € 0,74. Já a PCR convencional custa R\$ 2,45, sendo convertido para dólar e euro, o valor obtido foi, respectivamente, de US\$ 1,25 ou € 0,93.

10 DISCUSSÃO

A técnica LAMP preenche os requisitos básicos preconizados pela OMS para um teste diagnóstico ideal para a rotina de laboratórios clínicos de países em desenvolvimento com poucos recursos: especificidade, sensibilidade, rapidez, simplicidade, utilização de pouca quantidade de equipamentos e produtividade. Essas características são contempladas por fatores inerentes à técnica LAMP que, pela sua simplicidade, exige treinamento mínimo de recursos humanos, utilização de equipamento simples e o resultado é obtido rapidamente, podendo ser observado no próprio tubo, diminuindo a quantidade de etapas da reação (NJIRU, 2012).

Durante o processo de padronização da técnica LAMP para o diagnóstico da peste, o desenho adequado de *primers* específicos foi crucial para a ocorrência da reação. As reações foram incubadas em banho maria, dispensando assim o uso de termociclador, equipamento complexo e de alto custo (PARIDA et al., 2008), fato muito importante que facilita sua implementação em laboratórios rurais da rede de vigilância epidemiológica da peste no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

Segundo Tomita et al. (2008) o emprego de *primers* internos purificados pela técnica HPLC é crucial para a amplificação do gene alvo através do método LAMP, tendo em vista o tamanho da sequência desses *primers*, cerca de 45 pares de base. No nosso trabalho foram empregados, comparativamente, *primers* internos purificados por HPLC e dessalinizados na reação LAMP, obtendo-se resultado semelhante, permitindo adotar o uso de *primers* dessalinizados, que custam sete vezes menos.

Durante a amplificação por LAMP ocorre turbidez dos produtos de reação pela formação de precipitado branco, pela acumulação de pirofosfato de magnésio, em proporção aos produtos amplificados, entretanto, em alguns casos a visualização do resultado a olho nu, sob iluminação natural, requer o emprego de compostos cromogênicos que se ligam a fita dupla de DNA (CHAUDHARY et al., 2011). No nosso trabalho a adição desses compostos foi necessária para visualização do resultado das amplificações no próprio tubo sob iluminação ultravioleta, após adição de SYBR® Safe, e sob iluminação natural, após adição de SYBR® Green I. A visualização do resultado sob iluminação natural é importante porque reduz etapas e os custos com equipamentos. A visualização dos produtos a olho nu e por eletroforese em gel de agarose foi semelhante, a ocorrência ou não de amplificação foi igualmente detectada pelas duas técnicas.

A reação de LAMP ocorreu nas três temperaturas testadas (60°C, 63°C e 65°C), sendo adotada a temperatura de 65°C, que além de conferir maior estringência à reação, está na faixa de temperatura ótima de síntese de DNA pela Bst polimerase. A rapidez na obtenção do resultado dos exames é de extrema importância para o tratamento dos pacientes e acionamento das medidas de controle da peste (ALMEIDA; TAVARES, 2010). A técnica LAMP quando processada utilizando apenas os *primers* internos e externos, apresentou tempo mínimo para visualização dos resultados de 60 minutos, o emprego do *backward loop primer*, reduziu o tempo de reação para 45 minutos. O tempo de reação de uma PCR convencional para a amplificação do gene *caf1*, é cerca de 3 vezes maior, quando comparada com a técnica LAMP.

A sensibilidade da técnica LAMP foi semelhante a da PCR convencional, nos ensaios realizados em paralelo, e a da técnica Nested-PCR em tubo único, descrita por Silva et al. (2012), apresentado limiar de detecção de 10 pg de DNA.

A especificidade da técnica LAMP deve-se, sobretudo, as características dos *primers* utilizados na reação, além do emprego de quatro a seis *primers*, responsáveis pelo reconhecimento de seis a oito regiões distintas no gene alvo, os *primers* internos apresentam cerca de 45 pares de base, cobrindo uma região maior do gene alvo.

Um dos fatores críticos da técnica LAMP é o alto risco de contaminação da reação, por ser um método altamente sensível e gerar produto com alta concentração de amplicons, facilitando sua dispersão pelo ambiente. Portanto, é fundamental que para realização da técnica LAMP, assim como outras técnicas moleculares, se disponha de dois ambientes fisicamente separados, sendo um para a preparação da reação e outro para o processamento do resultado da reação, e sejam utilizados tubos, ponteiras e outros materiais descartáveis (TOMITA et al., 2008).

Apesar do uso de cabine de PCR, localizada em ambiente específico, ocorreu amplificação do gene alvo no controle negativo da reação de LAMP. As seguintes medidas foram adotadas para detectar a origem dessa contaminação: Utilização de água milliq obtida de outros laboratórios da instituição, uso de novas alíquotas do estoque de *primers*, MgSO₄, dNTP e betaine, nova extração de DNA, utilização de pipetas sem prévio contato com DNA da bactéria *Y. pestis*, utilização de ponteiras com filtro, realização da reação em diferentes bancadas no mesmo laboratório e realização da reação em cabine de PCR de outro laboratório da instituição. Foi constatada contaminação ambiental e para solucionar o problema as reações passaram a ser preparadas em outra cabine de PCR do laboratório.

Um dos fatores mais importantes para implementação da técnica LAMP na rotina laboratorial é seu baixo custo, quando comparado às técnicas moleculares convencionais. O custo por reação para amplificação do gene *caf1* foi estimado em R\$ 1,95, sendo necessário apenas equipamento para sua execução, o banho maria, enquanto a PCR convencional tem o custo estimado de R\$ 2,45 por reação, necessitando, obrigatoriamente, de termociclador, transiluminador ultravioleta, cubas de eletroforese, elevando ainda mais o seu custo. Comparativamente, em relação ao custo, a técnica LAMP é mais vantajosa do que a PCR convencional, apresentando custo 25% inferior ao observado na PCR convencional.

11 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho revelaram que a técnica LAMP possui alto potencial para ser utilizada no diagnóstico e em programas de vigilância e controle da peste; de simples e fácil operacionalização pode ser adotada nos laboratórios menos equipados no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

12 PERSPECTIVAS

Esse estudo apresenta como perspectivas:

- a) Testar a técnica LAMP aplicada à identificação de *Y. pestis* diretamente na cultura bacteriana, material biológico contaminado e vísceras de animais infectados com a bactéria;
- b) Produção de Kit LAMP liofilizado para vigilância epidemiológica da peste e distribuição em todo o território nacional pelo Serviço de Referência em Peste. Caso seja necessário, o Kit também poderá ser exportado para outros países.

REFERÊNCIAS

- ACHTMAN, M. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recent 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.
- ALMEIDA, A. M. P.; TAVARES, C. Peste. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2010. v.1, cap. 63, p. 1187-1200.
- ANISIMOV, A. P.; LINDLER, L. E.; PIER, G. B. Intraespecific diversity of *Yersinia pestis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.17, p.434-464, 2004.
- AUSUBEL, F. M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, **Greene Publishing Associates/Wiley Interscience**, New York, p.15-45, 1987.
- BRASIL – Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Peste**. Brasília, 2008.
- BRASIL – Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso**. Brasília, 2010a.
- BRASIL – Ministério da Saúde. **Classificação de Risco dos Agentes Biológicos**. Brasília, 2010b.
- BRENEVA, N. V.; MARAMOVICH, A. S.; KLIMOV, V. T. The population variability of *Yersinia pestis* in soil samples from the natural focus of plague. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii**, Moscow, v.2, p. 7–11, 2006.
- CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Estados Unidos). **Plague – Maps and Statistics**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/plague/maps/index.html>>. Acesso em: 30 jan. 2013.
- CHANTEAU, S. et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. **Lancet**, London, v. 361, n. 361, p. 211-216, 2003.
- CHASE, C. J. et al. Real-Time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.51, p. 1778-1785, 2005.
- CHAUDHARY, A. A. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based technology for authentication of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Protoplasma**, Leipzig, p. 417-422, 2011.
- CHEN, H. et al. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA by reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification. **Virology Journal**, London, v.8, p. 25-32, 2011.
- CHU, M. **Laboratory manual of plague diagnosis tests**. Geneve: WHO, 2000.
- 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, p. 8778, 2000.

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

DERBISE, A. et al. An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p. 1-11, 2012.

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

DU, Y. et al. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1453-1460, 2002.

EIKEN CHEMICAL. **Primer Explorer Software**. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>>. Acesso em: 25 ago. 2010.

ERLICH, H. A. et al. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. **Science**, Washington, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FILIPPOV, A. A. et al. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 67, p. 45-48, 1990.

FU, S. et al. Applications of Loop-mediated isothermal DNA amplification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, p. 845-850, 2011.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Manual de Controle dos Roedores**, Brasília, 2002.

GAGE, K. L., KOSOY, M. Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 505-528, 2005.

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

GAO, H. et al. Application of Loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 77, p. 198-201, 2009.

HINNEBUSCH, 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.

HINNEBUSCH, 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.

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

INGLESBY, T.V. et al. Plague as a Biological Weapon. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 283, p. 2281-2290, 2000.

KARIMI, Y. Diagnostic rapid del infection Pesteuseau laboratoire. **Bulletin de La Societé de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v. 71, p. 45-48, 1978.

KONEMAN, E. W. et al. Métodos moleculares em microbiologia clínica In: _____. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 1, p. 42-58.

KUBISTA, M. et al. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, London, v. 27, p. 95-125, 2005.

LEAL, N. C. et al. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 371-373, 1996.

LEAL, T. C. et al. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O: 3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 19-24, 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.; ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, p. 339-342, 1999.

LEAL-BALBINO, T. C. et al. Differences in the Stability of the Plasmids of *Yersinia pestis* Cultures in Vitro: Impact on Virulence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 727-732, 2004.

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

LIU, Z. et al. Evaluation of a Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of soft-shelled turtle iridovirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, p.11482-11487, 2011.

LOIEZ, C. et al. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 10, p. 4873-4875, 2003.

MELO, A. C.; ALMEIDA, A. M; LEAL, N. C. Retrospective study of a plague outbreak by multiplex-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 361-364, 2003.

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

MOLLARET, H. H. Experimental preservation of plague in soil. **Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique**, Paris, p. 1168-1182, 1963.

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

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 15, p. 62–69, 2009.

MURROS-KONTIAINEN, A. et al. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p.2363-2367, 2011a.

MURROS-KONTIAINEN, A. et al. *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p.2368-2372, 2011b.

NEERINCKX, S. et al. Predicting potential risk areas of human plague for the Western Usambara Mountains, Lushoto District, Tanzania. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, p. 492–500, 2010.

NJIRU, Z. K. Loop-mediated isothermal amplification technology: Towards point of care diagnostics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p.1572-1575, 2012.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 12, E63, 2000.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, p. 10-13, 2004.

OKADA, K. et al. A rapid, simple and sensitive Loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 66, p. 135–139, 2010.

OLIVEIRA, G. M. et al. Sifonápteros de roedores do foco de peste da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil: 2002-2008. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 38, p. 213-219, 2009.

OLIVEIRA, G. M. et al. Peste, uma doença ocupacional. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, p. 15-22, 2011.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **The Journal of Microbiology**, Seoul, p. 93–100, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **International health regulations**. 2 ed. Geneve, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004–2009. **Weekly epidemiological Record Relevé épidémiologique hebdomadaire**, Geneve, n 6, v. 85, p. 40-48, 2010.

PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v. 18, p. 407–421, 2008.

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.

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

PRENTICE, M. B.; RAHALISON, L. Plague. **Lancet**, London, p. 1196–1207, 2007.

QUINN, B. Oregon man recovering from rare case of the plague. **The Guardian**, London, 2012. Disponível em: <<http://www.guardian.co.uk/world/2012/jul/18/oregon-man-case-plague>>. Acesso em: 9 ago. 2012.

RAOULT, D. et al. Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12800-12803, 2000.

SALEH, M.; SOLIMAN, H.; EL- MATBOULI, M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. **BMC Veterinary Research**, London, v. 4, p. 1-10, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, L. C. et al. Plague diagnosis STNPCR and MPCR kits assembly, reaction reproducibility, and reagent stability. **Advances in Experimental and Medicine and Biology**. New York, v. 954, p.143-147, 2012.

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.

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

SOUZA, G. T. et al. Development and evaluation of a single tube nested-PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. **Advances in Experimental and Medicine and Biology**, New York, p. 350-358, 2007.

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

SRISUK, C. et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* by Loop-mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein ompW. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, p. 36-42, 2009.

STENSETH, N. C. et al. Plague: Past, Present and Future. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 5, p. 9-13, 2008.

SUCHKOV, I.U. et al. The possibility of preserving the causative agent of plague in soil in resting (nonculturable) form. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii**, Moscow, p. 42–46, 1997.

SULAKVELIDZE, A. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 497-513, 2000.

SUN, W.; ROLAND, K. L.; CURTISS III, R. Developing live vaccines against plague. **Journal of Infection in Developing Countries**, Rome, v. 5, p. 614-627, 2011.

TAVARES, C. et al. Plague in Brazil: from now and then. **Advances in experimental medicine and biology**, New York, v. 954, p.69-77, 2012.

TECHATHUVANAN, C.; DRAUGHON, F. A.; D'SOUZA, D. H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* from pork. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, p. 165-172, 2010.

TOMITA, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 877-882, 2008.

USHIKUBO, H. Principle of LAMP method - a simple and rapid gene amplification method. **Uirus**, Kyoto, p. 107–112, 2004.

ZAVIALOV, A. V. et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. **Cell**, Cambridge, v. 113, p. 587-596, 2003.

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

ZIPPER, H. et al. Investigation on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 294-299, 2004.

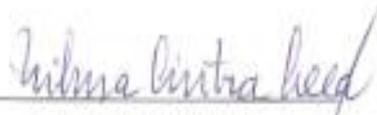
ANEXO A - CARTA À COORDENAÇÃO DA PÓS-GRADUAÇÃO DO CPqAM

Em anexo carta à coordenação da Pós-graduação do CPqAM, salientando que o projeto desenvolvido não necessita de aprovação do Comitê de Ética.

À Coordenação da Pós-graduação do CPqAM

Projeto: Aplicação da técnica *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste

O projeto não apresenta implicações éticas por se tratar de técnica a ser padronizada em laboratório e a cepa de *Yersinia pestis* que foi utilizada nos experimentos faz parte de uma Coleção Biológica do CPqAM/FIOCRUZ-PE, constituída por isolados provenientes de atividades do Ministério da Saúde em investigações de surtos, portanto de demanda espontânea.



Dra. Nilma Cintra Leal