

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Vladimir da Mota Silveira Filho

**Caracterização molecular dos fatores de
transmissão/patogenicidade e tipagem de cepas de
Yersinia pestis isoladas no Foco do Nordeste do Brasil**

Recife

2012

Vladimir da Mota Silveira Filho

**Caracterização molecular dos fatores de
transmissão/patogenicidade e tipagem de cepas de
Yersinia pestis isoladas no Foco do Nordeste do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

**Recife
2012**

Silveira Filho, Vladimir da Mota

Caracterização molecular dos fatores de transmissão/patogenicidade e tipagem de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no foco do Nordeste do Brasil/ Vladimir da Mota Silveira Filho. – Recife: O Autor, 2012.

110 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino

**Doutorado (tese) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2012.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Genética molecular 2. *Yersinia pestis* 3. Roedores como transmissores de doenças I. Balbino, Tereza Cristina Leal II. Título.**

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-082

Vladimir da Mota Silveira Filho

**Caracterização molecular dos fatores de
transmissão/patogenicidade e tipagem de cepas de *Yersinia
pestis* isoladas no Foco do Nordeste do Brasil**

Aprovado em 15 / 03 / 2012

Banca Examinadora:

**Dra. Tereza Cristina Leal Balbino (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)**

**Dra. Marcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco (UPE)**

**Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**

**Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

**Recife
2012**

Agradecimentos

Pelo trabalho

À Dra. Tereza Cristina e à Dra. Alzira Almeida, pelo acolhimento, orientação e confiança ao longo desses quatro anos.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), CAPES, CNPq e Serviço de Referência em Peste, pela infraestrutura e apoio financeiro.

Às grandes amigas Paloma Barros, Carina Lucena e Mariana Andrade, pelos debates, questionamentos, troca de informações e ensinamentos que temperaram nossos “almoços científicos”, ampliando nossos conhecimentos e senso crítico.

À Dra. Betânia Oliveira e Felipe Lira, pelas discussões e esclarecimentos sobre epidemiologia molecular e PCR em tempo-real.

Ao Dr. Tercilio Calsa Junior, Amaranta Malvezzi, Fabiana Cavalcanti, Mariana Marques, Nayara Lira e Cinthya Pacheco, por todo apoio nos experimentos com eletroforese bidimensional.

Ao apoio de toda equipe do Laboratório de Contenção Biológica Nível 3 (NB3) do CPqAM, José Luiz Magalhães, Tarcísio Oliveira e Edson (BioSafe).

À Dra. Gerlane Tavaves, Kátia Galindo e Dantas Sobrinho, pelo apoio na experimentação animal e diagnóstico sorológico de peste.

À equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM, Dra. Cássia Docena e Viviane Carvalho, pela contribuição com o sequenciamento de DNA e qRT-PCR.

A Dra. Nilma Leal, Silvana Santos, Fabiana Laura, Thiago André, Camila França, Milena Danda, Rosanny Holanda e toda equipe técnico-científica do Departamento de Microbiologia, sempre a postos para ajudar.

Aos membros da banca, que deixaram suas ocupações para generosamente contribuir com este trabalho.

Pelo incentivo

À força divina e apoio dos meus familiares.

Aos meus amigos do Departamento de Microbiologia (Danielle Moura, Janaína Nascimento, Rodrigo Pontes) e Entomologia (Diogo Chalegre, Liliane Amorim, Lígia Ferreira), pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos de Caruaru e do Recife, meu muito obrigado!



*"...o bacilo da peste nunca morre ou desaparece para sempre...
ele aguarda pacientemente seu tempo nos quartos, nos porões, nos baús,
nos lenços e na papelada...
e talvez esse dia chegue quando, para desgraça e ensinamento dos homens,
ele surja novamente em seus ratos e lhes encaminhem à morte
numa cidade feliz."*

Albert Camus
Albert Camus, *A Peste*

Resumo

A peste, zoonose causada pela bactéria *Yersinia pestis*, continua sendo uma ameaça mundial. Como outras enfermidades relacionadas à pobreza, a peste é considerada uma doença negligenciada nos países tropicais, incluindo Brasil, onde ainda há detecção sorológica de atividade pestosa em animais-sentinela nos focos naturais. A ausência de uma vacina segura/efetiva, o surgimento de cepas multirresistentes e a possibilidade de seu uso como arma biológica aumentaram o interesse nos estudos genéticos/epidemiológicos do patógeno. Este trabalho teve como objetivos (1) comparar dois métodos moleculares de tipagem para identificar qual deles é capaz de estabelecer melhor correlação temporal e geográfica entre isolados brasileiros de *Y. pestis*; e (2) aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de patogenicidade da bactéria. 25 cepas brasileiras de *Y. pestis* foram tipadas pela análise de múltiplos locos com número variável de repetições em tandem (MLVA) e pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A associação entre essas técnicas demonstrou, pela primeira vez, diversidade genética entre cepas brasileiras de *Y. pestis*. Contudo, apenas MLVA permitiu estabelecer correlação entre os isolados de diferentes eventos epidemiológicos, mostrando-se mais eficiente para tipagem de *Y. pestis*, em relação ao PFGE. Quatro cepas avirulentas P.CE 882/1R e 32R, P.Exu 369 e 390, e uma cepa controle indiana altamente virulenta (195P) foram comparadas a nível fenotípico, genotípico, transcricional e proteômico, a fim de identificar possíveis causas da perda de virulência. Não foi encontrada diferença fenotípica e genotípica entre os cinco isolados, onde foi detectada a presença dos genes *irp2*, *psn*, *ybtE* (localizados na Ilha de Alta Patogenicidade - HPI), *fur*, *hmsH*, YPO2271, YPO2281, *sodA*, *phoP*, *psaA* (cromossomais) e *pla*, *lcrV*, *ymt*, *caf1* (plasmidiais). Entretanto, a análise transcricional mostrou diferentes níveis de transcrição dos genes da HPI, apesar de nenhuma alteração estrutural de sequência ter sido detectada. Provavelmente a presença de ferro livre no meio de cultura utilizado ativou a proteína Fur, um regulador transcricional negativo da HPI. A análise quantitativa revelou níveis de transcrição dos genes da HPI acima do esperado nas cepas P.Exu 369 e 390, sugerindo possível disfunção no mecanismo regulatório da captura de ferro. A análise proteômica da subcultura P.CE 882/1R sugere que distúrbios metabólicos decorrentes do subcultivo e/ou estocagem podem estar associados ao fenótipo de avirulência. Estes achados sobre os mecanismos de virulência de *Y. pestis* poderão contribuir para identificação de alvos importantes para o desenvolvimento de novas vacinas e abordagens terapêuticas contra a peste.

Palavras-chave: peste; MLVA; PFGE; Ilha de Alta Patogenicidade; análise transcricional e proteômica.

Abstract

Plague, a zoonosis caused by the bacterium *Yersinia pestis*, remains as a global threat. As other poverty related diseases, plague is considered a neglected disease in tropical countries, including Brazil, where serological activity is still detected in sentinel animals in the natural foci. The lack of safe/effective vaccine and the rise of multiresistant strains and the possibility of its use as a biological weapon increased the interest in genetic/epidemiological studies of this pathogen. This work aimed (1) to compare two molecular typing methods to identify which offers better temporal and geographical correlation among Brazilian *Y. pestis* isolates; and (2) to further understand the pathogenicity mechanisms of the bacteria. 25 Brazilian strains of *Y. pestis* were typed by analysis of multiple loci with variable number of tandem repeats (MLVA) and by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Association between these techniques demonstrated for the first time genetic diversity among Brazilian *Y. pestis* strains. However, only MLVA allowed establishing a correlation between isolates from different epidemiological events, proving to be more efficient for *Y. pestis* typing than PFGE. Four avirulent strains P.CE 882/1R and 32R, P.Exu 369 and 390, and a highly virulent Indian control strain (195P) were compared at phenotypic, genotypic, transcriptional and proteomic level in order to identify possible causes of virulence loss. No phenotypic and genotypic difference was found among the five isolates, which detected the genes *irp2*, *psn*, *ybtE* (from the High Pathogenicity Island - HPI), *fur*, *hmsH*, YPO2271, YPO2281, *sodA*, *phoP*, *psaA* (chromosomal) and *pla*, *lcrV*, *ymt*, *cafI* (plasmidial). However, the transcriptional analysis indicated different transcription levels of the HPI genes, although no structural change on sequence being detected. Probably the presence of free iron in the culture medium activated the protein Fur, a negative HPI transcriptional regulator. Quantitative analysis revealed higher than expected transcription levels of P.Exu 369 and 390 HPI genes, suggesting possible alteration in the iron uptake regulation mechanism. The proteomic analysis of the subculture P.CE 882/1R suggests that metabolic disturbances resulting from the subculture and/or storage may be associated with avirulence phenotype. Those findings about mechanisms of virulence of *Y. pestis* may contribute to identify important targets for development of new vaccines and therapies against plague.

Keywords: plague; MLVA; PFGE; High Pathogenicity Island; transcriptional and proteomic analysis.

Lista de Ilustrações

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Visualização de <i>Yersinia pestis</i> em microscopia ótica e eletrônica.	3
Figura 2. Ciclo epidemiológico da peste.	5
Figura 3. Espécimes dos principais roedores hospedeiros da peste no Brasil.	6
Figura 4. Espécies de pulgas identificadas como vetores da peste no Brasil.	7
Figura 5. Principais formas clínicas da peste.	8
Figura 6. Dispersão histórica das pandemias de peste.	13
Figura 7. Reemergência da peste após períodos de silêncio epidemiológico.	14
Figura 8. Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009 no mundo.	15
Figura 9. Distribuição da peste no mundo.	16
Figura 10. Principais áreas de foco da peste no Brasil.	16
Figura 11. Distribuição do número de casos de peste humana registrados entre 1935 e 2010 no Brasil.	17
Figura 12. Municípios do Estado de Pernambuco com registro sorológico de peste entre 2005 e 2010.	18
Figura 13. Representação do cromossomo da cepa CO92 de <i>Yersinia pestis</i> .	20
Figura 14. Representação do plasmídio pYV/pCD1 da cepa CO92 de <i>Yersinia pestis</i> .	22
Figura 15. Representação do plasmídio pFra/pMT1 da cepa CO92 de <i>Yersinia pestis</i> .	23

Figura 16. Representação do plasmídio pPst/pCP1 da cepa CO92 de <i>Yersinia pestis</i> .	24
Figura 17. Esquema representativo do genoma de <i>Yersinia pestis</i> , indicando a localização dos principais genes associados à virulência.	25
Figura 18. Estrutura canônica da Ilha de Alta Patogenicidade (HPI) de <i>Yersinia pestis</i> .	28
Figura 19. Ação do biofilme de <i>Yersinia pestis</i> na pulga (<i>Xenopsylla cheopsis</i>).	29
Figura 20. Região intergênica <i>irp2/ybtA</i> de <i>Yersinia pestis</i> , destacando o sítio de ligação para o repressor de transcrição Fur na região operadora do <i>irp2</i> .	30
Figura 21. Eletromicrografia de varredura de <i>Yersinia pestis</i> mostrando a regulação térmica na expressão do polímero de F1.	33
Figura 22. Esquema representativo de um loco VNTR de <i>Yersinia pestis</i> com cinco unidades repetitivas, constituídas por 17 pb.	38
Figura 23. Localização dos municípios e respectivas áreas de foco onde foram isoladas as 25 cepas de <i>Yersinia pestis</i> analisadas na tipagem molecular.	41
Figura 24. Esquema do sequenciamento <i>Primer Walking</i> para cobertura dos genes <i>ybtE</i> + <i>psn</i> e <i>irp2</i> da HPI de <i>Yersinia pestis</i> .	52
Figura 25. Número de alelos ^(y) e índice discriminatório ^(z) dos sete locos VNTRs polimórficos ^(x) entre 24 isolados de <i>Yersinia pestis</i>	57
Figura 26. Dendrograma UPGMA gerado pela análise do polimorfismo de 12 locos VNTRs entre cepas <i>Yersinia pestis</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	58

Figura 27. Gel representativo do teste de estabilidade frente a diferentes tempos de restrição pela enzima <i>Ascl</i> na técnica de PFGE.	59
Figura 28. Dendrograma gerado pela análise UPGMA dos perfis de macrorrestrição (PFGE <i>Ascl</i>) entre cepas brasileiras de <i>Yersinia pestis</i> .	60
Figura 29. Resultados dos testes fenotípicos <i>in vitro</i> de <i>Yersinia pestis</i> para sensibilidade térmica e de pigmentação em Ágar Vermelho Congo.	61
Figura 30. Géis representativos da extração plasmidial e das PCRs direcionadas a 14 genes determinantes de virulência de <i>Yersinia pestis</i> .	62
Figura 31. Eletroferograma e alinhamento múltiplo das sequências dos genes <i>ybtE</i> , <i>psn</i> e <i>irp2</i> da HPI de <i>Yersinia pestis</i> .	63
Figura 32. Gel representativo da extração de RNA total de <i>Yersinia pestis</i> .	64
Figura 33. Géis representativos da análise transcricional dos 14 determinantes de virulência de <i>Yersinia pestis</i> .	64
Figura 34. Curva padrão do teste de eficiência da qRT-PCR e curva de <i>melt</i> dos genes <i>ybtE</i> , <i>psn</i> , <i>irp2</i> e <i>rpsL</i> de <i>Yersinia pestis</i> .	65
Figura 35. Gráficos da curva de amplificação, dispersão linear e logarítmica da quantificação relativa dos genes <i>ybtE</i> , <i>psn</i> e <i>irp2</i> de <i>Yersinia pestis</i> .	67
Figura 36. Géis representativos da eletroforese bidimensional (pH 3-10 NL) das triplicatas das amostras 195P e P.CE882/1R de <i>Yersinia pestis</i> .	68
Figura 37. Representação tridimensional de <i>spots</i> (destacados em verde) diferencialmente e exclusivamente expressos em cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	69

Lista de Tabelas

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
Tabela 1. Dados epidemiológicos das cepas de <i>Yersinia pestis</i> utilizadas no estudo de tipagem	42
Tabela 2. Descrição dos locos VNTRs de <i>Yersinia pestis</i> analisados	43
Tabela 3. Genes de <i>Yersinia pestis</i> investigados por PCR	49
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados no sequenciamento dos genes <i>ybtE</i> , <i>psn</i> e <i>irp2</i> da HPI de <i>Yersinia pestis</i>	51
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados na qRT-PCR dos genes da HPI de <i>Yersinia pestis</i>	53
Tabela 6. Número de repetições dos 12 locos VNTRs de <i>Yersinia pestis</i> analisados	56
Tabela 7. Análise do grau de virulência de cepas de <i>Yersinia pestis</i> em camundongos (<i>Mus musculus</i>) da linhagem Swiss Webster	62
Tabela 8. Resultados da análise de transcrição de 14 determinantes de virulência de <i>Yersinia pestis</i> por RT-PCR	65

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
$\Delta\Delta CT$	algoritmo para quantificação relativa de expressão gênica
195P	cepa indiana de <i>Yersinia pestis</i> altamente virulenta
1AB	loco VNTR
2D	bidimensional
A1122	cepa de <i>Yersinia pestis</i> Pgm-
ANOVA	análise de variância
Antígeno V	antígeno de virulência de <i>Yersinia</i> sp.
AT	adenina e timina
BAB	base para agar sangue
BALBc/An	linhagem <i>inbred</i> de camundongo (<i>Mus musculus</i>)
BHI	infusão de cérebro e coração (<i>Brain and Heart Infusion</i>)
C57BL/6	linhagem <i>inbred</i> de camundongo (<i>Mus musculus</i>)
caf1	gene do antígeno capsular Fração 1 (<i>capsular antigen Fraction 1</i>)
CBA	linhagem <i>inbred</i> de camundongo (<i>Mus musculus</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	DNA complementar
CDS + / -	sequência codificante <i>sense</i> / <i>anti-sense</i>
CO92	cepa norte-americana de <i>Yersinia pestis</i>
CPqAM/Fiocruz	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz
CRISPR	grupos de repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas (<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
<i>D</i>	índice discriminatório
Da	Daltons
DL ₅₀	dose letal mediana
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)

dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado (<i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
EV76	cepa vacinal de <i>Yersinia pestis</i>
F1	antígeno capsular Fração 1
<i>fur</i>	gene do regulador da captura de ferro (<i>ferric uptake regulator</i>)
GC	guanina e citosina
GenBank	banco de dados genômico do NCBI
<i>hms</i> (_□)	genes de estocagem de hemina (<i>hemin storage</i>)
HMS	segmento de estocagem de hemina (<i>hemin storage</i>)
HPI	ilha de alta patogenicidade (<i>high-pathogenicity island</i>)
IP32953	cepa francesa de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>irp</i> (#)	genes de proteínas reguladas pelo ferro (<i>iron-regulated proteins</i>)
IS(#)	sequência de inserção (<i>insertion sequence</i>)
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
LCRS	genes de estímulo-resposta à baixas concentrações de Cálcio (<i>low-calcium response stimulon</i>)
<i>lcrV</i>	gene do antígeno V
LOS	lipooligossacarídeo
LPS	lipopolissacarídeo
Mb	megabases
MLVA	análise de múltiplos locos VNTR (<i>multiple locus VNTR analysis</i>)
<i>ms</i> (#)	loco VNTR
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NL	não-linear
OMS	Organização Mundial de Saúde (<i>alias WHO</i>)
ORF	quadro aberto de leitura (<i>open reading frame</i>)
P.CE (#)	cepas de <i>Yersinia pestis</i> isoladas no Ceará
P.CE 882/1R	primeiro repique da cepa P.CE 882
P.CE 882/32R	trigésimo segundo repique da cepa P.CE 882
P.Exu (#)	cepas de <i>Yersinia pestis</i> isoladas em Pernambuco

P.PB (#)	cepas de <i>Yersinia pestis</i> isoladas na Paraíba
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
pCD1	plasmídio prototípico de yersínias patogênicas (<i>alias</i> pYV)
pCP1	plasmídio prototípico de <i>Yersinia pestis</i> (<i>alias</i> pPst e pPla)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR-multiplex	PCR com mais de um alvo na reação
PCR-ribotipagem	PCR da região espaçadora 16S-23S do rDNA
PCR-uniplex	PCR com um único alvo na reação
PFGE	eletroforese em gel de campo pulsado (<i>pulsed field gel electrophoresis</i>)
pFra	plasmídio prototípico de <i>Yersinia pestis</i> (<i>alias</i> pMT1)
<i>pgm</i>	loco de pigmentação
Pgm-	colônia negativa no teste de pigmentação em Agar Vermelho Congo (brancas)
Pgm+	colônia positiva no teste de pigmentação em Agar Vermelho Congo (vermelha)
<i>phoP</i>	gene regulador transcricional
<i>pim</i>	gene de imunidade à pesticina (<i>pesticin immunity</i>)
<i>pla</i>	(<i>plasminogen activator</i>) gene do ativador do plasminogênio
pMT1	plasmídio prototípico de <i>Yersinia pestis</i> (<i>alias</i> pFra)
pPla	plasmídio prototípico de <i>Yersinia pestis</i> (<i>alias</i> pPst e pCP1)
pPst	plasmídio prototípico de <i>Yersinia pestis</i> (<i>alias</i> pPla e pCP1)
<i>psa</i>	gene do antígeno expresso em pH 6.0 (<i>pH6-antigen</i>)
<i>psn</i>	gene do receptor da pesticina (<i>pesticin receptor</i>)
<i>pst</i>	gene da pesticina (<i>pesticin</i>)
pYV	plasmídio prototípico de yersínias patogênicas (<i>alias</i> pCD1)
qRT-PCR	PCR quantitativa da transcrição reversa
RAPD	polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (<i>random amplification polymorphism DNA</i>)
rDNA	DNA codificador de RNA ribossomal

RFLP	polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
<i>rpsL</i>	gene da proteína ribossomal S12 (<i>ribosomal protein S12</i>)
RT-PCR	PCR do produto da transcriptase reversa
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
<i>sodA</i>	gene da superóxido-desmutase cofatoriada com Manganês (<i>Mn-cofactored superoxide dismutase</i>)
SPF	condição sanitária livre de patógenos específicos (<i>specific pathogen free</i>)
SRP	Serviço de Referência em Peste
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE 0.5x	44.5 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0; 44.5 mM ácido bórico
tDNA	DNA codificador de RNA transportador
TE 10:1	10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA
UFC	unidade formadora de colônia
UPGMA	método de agrupamento não-ponderado por média aritmética (<i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>)
VNTR	número variável de repetições em tandem (<i>variable number repeat tandem</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
<i>ybt</i> (<u> </u>)	genes da yersiniabactina (<i>yersiniabactin</i>)
<i>ymt</i>	gene da toxina murina de yersínia (<i>yersinia murine toxin</i>)
Yop	proteína externa de yersínia (<i>yersinia outer protein</i>)
YpfΦ	profago filamentoso de <i>Yersinia pestis</i> (<i>Yersinia pestis filamentous phage</i>)
YPO(#)	gene do YpfΦ associado à virulência (função desconhecida)

Sumário

<i>Conteúdo</i>	<i>Página</i>
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	
2.1. Agente Etiológico da Peste	3
2.2. Ciclo Epidemiológico	5
2.3. Formas Clínicas	8
2.4. Diagnóstico e Tratamento	9
2.5. Controle e Prevenção	11
2.6. Histórico	12
2.7. Situação Atual da Peste	14
2.8. Evolução de <i>Yersinia pestis</i>	18
2.9. Genoma de <i>Yersinia pestis</i>	
2.9.1. Cromossomo	20
2.9.2. Plasmídios	21
2.9.2.1. <i>pYV</i>	21
2.9.2.2. <i>pFra</i>	22
2.9.2.3. <i>pPst</i>	24
2.10. Determinantes de Virulência	25
2.10.1. Loco <i>pgm</i>	26
2.10.1.1. <i>HPI</i>	26
2.10.1.2. <i>HMS</i>	28
2.10.2. <i>fur</i>	29
2.10.3. <i>YpfΦ</i>	30
2.10.4. <i>sodA</i>	30
2.10.5. <i>psa</i>	31
2.10.6. LOS	31

2.10.7. <i>phoP</i>	32
2.10.8. <i>caf1</i>	33
2.10.9. <i>ymt</i>	34
2.10.10. LCRS	34
2.10.11. <i>pla</i>	35
2.9.12. <i>pst</i> e <i>pim</i>	36
2.11. Epidemiologia molecular de <i>Y. pestis</i>	36
2.11.1. MLVA	37
2.11.2. PFGE	38
3. Objetivos	40
4. Material e Métodos	
4.1. Tipagem molecular	
4.1.1. Cepas de <i>Y. pestis</i>	41
4.1.2. MLVA	42
4.1.3. Análise discriminatória	44
4.1.4. PFGE	44
4.2. Estudo de virulência	
4.2.1. Bactérias e condições de cultivo	46
4.2.2. Crescimento à 37°C	46
4.2.3. Pigmentação em Agar Vermelho Congo	47
4.2.4. Avaliação do grau de virulência	47
4.2.5. Extração do DNA plasmidial	48
4.2.6. Extração do DNA genômico	48
4.2.7. PCR-uniplex e PCR-multiplex	48
4.2.8. Sequenciamento de genes da HPI	50
4.2.9. Extração de RNA	52
4.2.10. RT-PCR	52

4.2.11. qRT-PCR	53
4.2.12. SDS-PAGE do extrato proteico	54
4.2.13. Eletroforese bidimensional do extrato proteico	54
5. Resultados	
5.1. Tipagem molecular	56
5.2. Estudo de virulência	61
6. Discussão	
6.1. Tipagem molecular	70
6.2. Estudo de virulência	72
7. Conclusões	77
8. Referências	78
9. Anexos	
9.1. Artigo aceito para publicação	93
9.2. Artigo em revisão	103
10. Memorial	110

1. Introdução

Yersinia pestis é o agente causador da peste, uma doença enzoótica específica que afeta roedores e suas pulgas, as quais transmitem a doença ao homem e a outros mamíferos. O homem se contamina ao entrar acidentalmente no ecossistema da infecção, nas suas atividades de caça, agricultura, lazer ou pela introdução de pulgas e animais infectados nos seus habitats.

A peste ainda constitui um problema para saúde pública, uma vez que persiste em vários focos naturais em países da África, Ásia e do continente Americano, além do risco de ser utilizada como arma biológica. É considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença reemergente, o que exige vigilância permanente dos focos e monitoramento contra a possível introdução de novas cepas de outros focos. No Brasil, a incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias declinaram nas áreas de foco, no entanto, ainda é detectada atividade residual de peste nos animais-sentinela.

O surgimento de cepas multirresistentes, com novos ribotipos e o risco de ser utilizada como arma biológica tem aumentado o interesse pelo estudo de *Y. pestis*. Entretanto, pouco se sabe sobre sua manutenção na natureza, seus mecanismos de patogenicidade e a contribuição da diversidade genética associada a essas características.

Vários estudos, utilizando diferentes técnicas feno e genotípicas, têm demonstrado baixo poder discriminatório entre as cepas de *Y. pestis* isoladas no Brasil. Contudo, análises do número variável de repetições em tandem e do padrão de macrorrestrição cromossomal revelaram diversidade genética entre esses isolados. A caracterização de marcadores capazes de mostrar diferenças entre cepas provenientes de diversos focos e países é de grande interesse epidemiológico, pois auxiliará na detecção de reservatórios e fontes de infecção, assim como no monitoramento de sua dispersão dentro e entre as populações estudadas.

Após o sequenciamento genômico de diversas cepas de *Y. pestis*, foram identificados vários genes relacionados à sua virulência. Contudo, alguns genes permanecem sem função esclarecida dentro dos mecanismos de patogenicidade e transmissão da doença.

A vacina contra peste atualmente disponível não oferece cobertura para todas as formas de transmissão da doença. Os conhecimentos adquiridos sobre os mecanismos de patogenicidade e transmissão da peste contribuirão para identificação de alvos para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra este patógeno.

Neste trabalho, será avaliada a eficiência de dois métodos de tipagem molecular, a fim de identificar qual deles é capaz de estabelecer melhor correlação temporal e geográfica entre isolados brasileiros de *Y. pestis*, provenientes de diferentes fontes, origens e eventos epidemiológicos. Além disso, será realizada uma investigação molecular para identificar o(s) motivo(s) da perda de virulência entre quatro isolados de *Y. pestis*, utilizando uma cepa altamente virulenta como controle.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Agente Etiológico da Peste

O gênero *Yersinia* pertence à família Enterobacteriaceae e é composto por 17 espécies que podem ser diferenciadas entre patogênicas (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*) e não-patogênicas (*Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* e *Y. pekkanenii*). *Y. ruckeri* é considerado um caso à parte, pois, apesar da divergência genômica, a inclusão deste patógeno de peixes no gênero *Yersinia* ainda é convencional (Grandis *et al.*, 1988; Carniel, 2008; Merhej *et al.*, 2008; Sprague *et al.*, 2008; Hurst *et al.*, 2011; Murros-Kontinen *et al.*, 2011a,b).

Como diversas outras espécies de Enterobacteriaceae, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são enteropatógenos transmitidos pela via oral-fecal e que promovem o quadro clínico denominado yersiniose. Já *Y. pestis* (Figura 1) é o agente causador da peste, uma doença zoonótica de caráter agudo, transmitida primariamente por pulgas e caracterizada por períodos quiescentes e epizooticos (Carniel, 2008; Eisen & Gage, 2009).

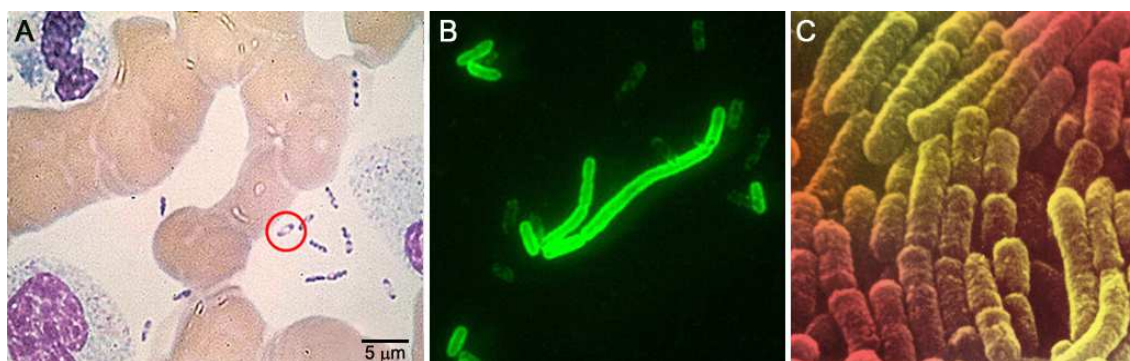


Figura 1: Visualização de *Yersinia pestis* em microscopia ótica e eletrônica. **A.** No destaque, bacilo corado pela técnica Wright-Giemsa observado por microscopia ótica (1000X); **B.** Imunofluorescência direta do bacilo (2000X); **C.** Eletromicrografia de varredura de uma colônia de *Y. pestis* (15000X). (Fontes: A e B: CDC; C: Chen & Elberg, 1977)

Esta bactéria se apresenta em microscopia óptica como um bacilo Gram-negativo, curto (2.0 x 0.5 µm), ovoide, não formador de esporos e com coloração bipolar pelo método Wright-Giemsa (Figura 1A). É aeróbica ou anaeróbica facultativa, sem motilidade, crescendo bem a 28°C (mesofílica), pH entre 5 e 9. Um aspecto extremamente importante é sua capacidade de permanecer viável (anos) em materiais como escarro, fezes de pulgas e tecidos protegidos (medula óssea), principalmente a baixas temperaturas (SVS, 2008).

As cepas de *Y. pestis* são muito homogêneas fenotipicamente, caracterizando-se por apresentar um sorotipo, um fagotipo e quatro biotipos (biovars), baseados na habilidade de fermentar glicerol e arabinose e reduzir nitrato: *Antiqua* (glicerol⁺, arabinose⁺ e nitrato⁺); *Medievalis* (glicerol⁺, arabinose⁺ e nitrato⁻); *Orientalis* (glicerol⁻, arabinose⁺ e nitrato⁺) e *Microtus* (glicerol⁺, arabinose⁻ e nitrato⁻) (Leal-Balbino *et al.*, 2009).

Os três primeiros biovars foram associados às três últimas pandemias do passado e foram classificados segundo Devignat (1953). Estes biovars não diferem quanto ao nível de patogenicidade nem à forma clínica da doença (Perry & Fetherston, 1997). O biovar *Microtus*, isolado na China, é avirulento para humanos, embora seja capaz de causar epizootias em algumas regiões do mundo (Zhou *et al.*, 2004).

Recentemente, foi proposta a designação de um novo biotipo, *Intermedium*, para cepas raminose⁺, que apresenta como principal hospedeiro a marmota, infectando o homem de forma ocasional (Li *et al.*, 2009).

Embora, a classificação das cepas de *Y. pestis* em diferentes biotipos seja amplamente aceita entre os grupos de pesquisas, os pesquisadores russos utilizam o termo subespécies em sua nomenclatura. Os chineses baseiam-se em testes bioquímicos e fazem uso de uma classificação própria, através do termo ecotipo (Anisimov *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009).

2.2. Ciclo Epidemiológico

Y. pestis possui dois ciclos de vida distintos. Seu ciclo de vida natural é conhecido como ciclo zoonótico-silvestre (Figura 2A), onde a bactéria é transmitida essencialmente por pulgas. Quando este vetor encontra algum hospedeiro similar num cenário urbano, o ciclo passa a se chamar zoonótico-urbano (Figura 2B). Se, em algum momento desses ciclos, um humano ou outro mamífero entrar em contato com qualquer componente infeccioso (pulga, tecidos, aerossol), eles podem se infectar com a bactéria e desenvolver os sintomas da peste. O deslocamento humano, de animais ou carcaças com peste também deve ser levado em consideração devido ao seu potencial de transmissão e formação de epidemias alóctones (Leal-Balbino et al., 2009).

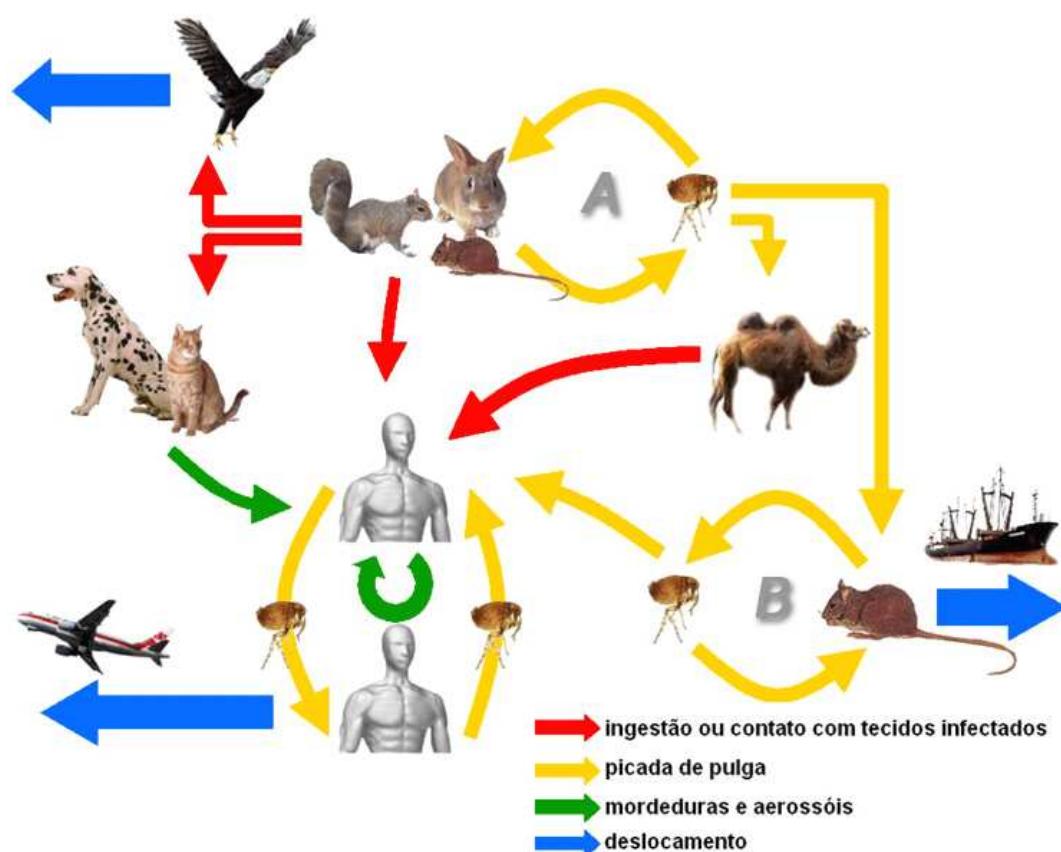


Figura 2: Ciclo epidemiológico da peste. **A.** ciclo zoonótico-silvestre; **B.** ciclo zoonótico-urbano. (Fonte: Leal-Balbino et al., 2009)

As principais fontes de infecção da peste, na natureza, são os roedores e estima-se que cerca de 200 espécies estejam envolvidas no ciclo epidemiológico. Cada foco pode apresentar uma fauna distinta. No Brasil, os principais roedores relacionados ao ciclo epidemiológico da peste pertencem aos gêneros *Necomys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Galea*, *Thrichomys*, *Oryzomys* e *Rattus* (Figura 2).

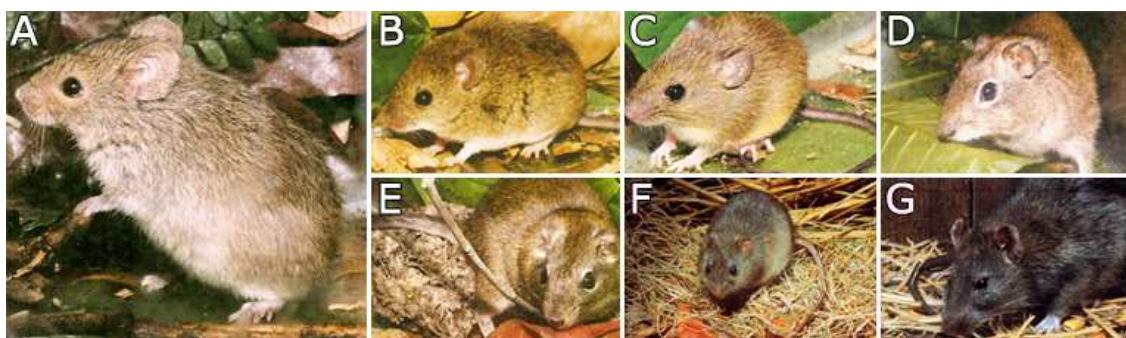


Figura 3: Espécimes dos principais roedores hospedeiros da peste no Brasil. **A.** *Necomys* sp.; **B.** *Calomys* sp.; **C.** *Oligoryzomys* sp.; **D.** *Galea* sp.; **E.** *Thrichomys* sp.; **F.** *Oryzomys* sp.; **G.** *Rattus* sp. (Fontes: A-E: Bonvicino *et al.*, 2008; F e G: Copyright Roger Barbour - www.discoverlife.org)

Algumas espécies de roedores podem apresentar maior resistência à peste, enquanto outras, como *Necomys lasiurus*, são passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção (Almeida *et al.*, 2005).

A picada de pulgas é a principal forma de transmissão da doença (Almeida *et al.*, 2005). São considerados, pelo menos, três mecanismos diferentes de transmissão, que podem ser mais ou menos importantes, de acordo com a espécie de pulga vetora e os diferentes estágios epizootiológicos.

A *transmissão biológica* depende da multiplicação bacteriana no intestino e proventrículo da pulga, chegando a bloquear (total ou parcialmente) esses órgãos. Os bacilos pestosos são regurgitados durante a tentativa de repasto em um novo hospedeiro (Hinnebusch & Erickson, 2008). A *transmissão precoce* não depende da multiplicação da bactéria no organismo da pulga, mas resulta da regurgitação de material infectante ao picar um hospedeiro não-infectado (Eisen *et al.*, 2006). A *transmissão mecânica* ocorre eventualmente, quando a pulga se alimenta em um

hospedeiro septicêmico e logo depois realiza o repasto em um novo hospedeiro, inoculando bactérias que estão no exterior do seu aparelho bucal (Burroughs, 1947).

Mais de 200 espécies de pulgas já foram encontradas infectadas com *Y. pestis* (Eisen & Gage, 2009). Nos focos de peste do Nordeste do Brasil, as espécies de pulgas mais relevantes são *Polygenis bohlsi jordani*, *Xenopsylla cheopis*, *Pulex irritans* e *Ctenocephalides felis*, as quais foram encontradas naturalmente infectadas por *Y. pestis* (Almeida *et al.*, 2005) (Figura 3).

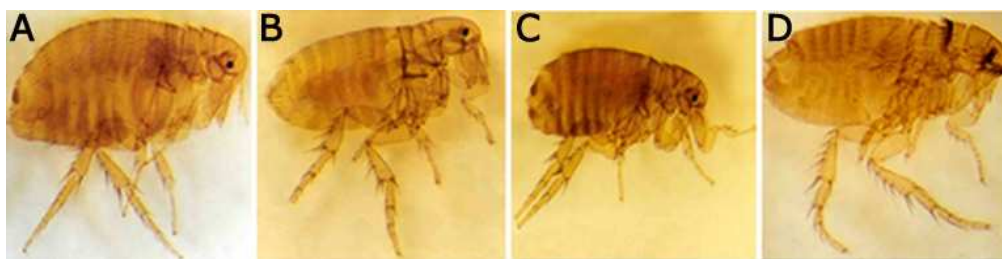


Figura 4: Espécies de pulgas identificadas como vetores da peste no Brasil. **A.** *Polygenis bohlsi jordani*; **B.** *Xenopsylla cheopis*; **C.** *Pulex irritans*; **D.** *Ctenocephalides felis* (Cedido por Almeida, AMP).

Além de vetores da peste, as pulgas agem como reservatórios da zoonose, desempenhando importante papel na manutenção da doença, uma vez que estes artrópodes são capazes de viver por meses no interior das tocas dos roedores. Este microclima favorece a sobrevivência de *Y. pestis*, que é eliminada no solo juntamente com as fezes das pulgas (Eisen & Gage, 2009).

Cães e gatos de estimação, pela condição de predadores, podem carrear pulgas infectadas por *Y. pestis*, como também desenvolver a infecção ao ingerir roedores infectados (Perry & Fetherston, 1997). Os cães habitualmente não desenvolvem manifestações clínicas, enquanto os gatos podem apresentar as formas ganglionar, faríngea e a pneumônica da doença. Caso sobrevivam à infecção, esses animais chegam a produzir anticorpos específicos por até um ano, tornando-os animais-sentinela importantes para vigilância epidemiológica nos focos de peste (WHO, 1999). As aves são refratárias à infecção, mas têm

importância no ciclo epidemiológico por deslocarem carcaças de roedores infectados e suas pulgas à longa distância (Leal-Balbino *et al.*, 2009).

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

2.3. Formas Clínicas

A peste humana pode apresentar três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica (Figura 5). A peste bubônica é a forma mais prevalente, correspondendo a 80-95% dos casos, com mortalidade de 10-20% (WHO, 2003) e se caracteriza pela presença de um bubão (tumefação dos linfonodos) na região próxima da picada da pulga. O bubão aparece no segundo ou terceiro dia, resultado da inflamação aguda dos linfonodos que drenam a área de inoculação do bacilo, sendo extremamente dolorido (WHO, 1999; SVS, 2005).



Figura 5: Principais formas clínicas da peste. **A.** Bubônica: seta indicando o bubão axilar; **B.** Septicêmica: capaz de causar necrose nas extremidades dos membros; **C.** Pneumônica: aspecto do pulmão extraído de uma vítima de peste pneumônica. (**Fontes:** A e B: CDC; C: Palmer & Reeder, 2001)

Alguns pacientes (10-20%) podem desenvolver sepse sistêmica sem a formação de bubão (peste septicêmica primária) ou derivada da peste bubônica (peste septicêmica secundária). A bacteremia pode resultar em necrose pelo acúmulo do bacilo e suas toxinas nas extremidades dos membros. Esta forma

clínica apresenta uma mortalidade de 22%, quando não tratada (Inglesby *et al.*, 2000; SVS, 2005).

Um paciente septicêmico pode evoluir para um quadro pneumônico (peste pneumônica secundária), que resulta na dispersão do bacilo pela formação de aerossóis. A inoculação direta do bacilo pela via respiratória após inalação de aerossóis, contato com tecidos de animais infectados ou mesmo por um artefato terrorista pode acarretar na peste pneumônica primária. Pacientes pneumônicos apresentam um quadro infeccioso grave e de evolução rápida, com sintomas de delírio e coma (SVS, 2008). Apesar de rara, é considerada a forma mais perigosa da doença, pelo alto grau de contágio, consequente capacidade de provocar epidemias e elevada taxa de mortalidade ($\cong 100\%$ se não for tratada e $>50\%$ com antibioticoterapia) (Prentice & Rahalison, 2007).

Além dessas formas graves, existe uma forma benigna ou ambulatorial, denominada peste benigna ou *pestis minor*, com discreto comprometimento ganglionar, febre baixa e cura espontânea (Almeida *et al.*, 2005; SVS, 2005).

2.4. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico precoce da peste é de extrema importância, não somente para salvar a vida do paciente, como também para que a vigilância epidemiológica adote as condutas cabíveis para evitar a ocorrência de epidemias. A notificação do caso ou do surto à autoridade sanitária competente deve ser imediata. Para tanto, é necessário que os médicos e agentes de saúde conheçam profundamente a nosologia regional, permitindo-lhes caracterizar uma doença como peste, fechando o diagnóstico ou descartando o caso (SVS, 2008).

O diagnóstico pode ser baseado nos sinais clínicos, com o suporte do diagnóstico laboratorial (isolamento bacteriano e tiras reativas) e/ou molecular (PCR-nested, PCR-multiplex), a partir do sangue, esputo ou aspirado de linfonodo (Prentice & Rahalison, 2007; SVS, 2008). Caso o paciente já se encontre em fase de recuperação, é importante a coleta de sangue para diagnóstico sorológico

(hemaglutinação e inibição da hemaglutinação). A Secretaria de Vigilância em Saúde preconiza ainda que os familiares e animais próximos ao paciente também sejam investigados, para identificar e prevenir possíveis fontes de transmissão da peste.

Visando deter a bacteremia e superar a toxemia, o tratamento contra a peste deve ser instituído o mais precocemente possível, devido à rapidez na evolução da doença (SVS, 2008). Nos EUA, recomenda-se que o paciente permaneça estritamente isolado durante as primeiras 48 horas do tratamento, pelo risco de pneumonia (Almeida *et al.*, 2005).

Y. pestis é sensível à maioria dos antibióticos, com exceção de betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapanemas, etc.), macrolídeos (eritromicina) e azalídeos (azitromicina), que mostram-se ineficazes *in vivo* (SVS, 2008). A estreptomicina é o medicamento de eleição nos casos de peste pneumônica, podendo ser associada à tetraciclina ou cloranfenicol nos casos de pneumonia e meningite. A gentamicina é uma excelente opção independentemente do quadro clínico, sendo indicada para gestantes e crianças (Almeida *et al.*, 2005). Os bubões raramente requerem cuidados locais, envolvendo com a antibioticoterapia sistêmica e drenagem (SVS, 2008).

Em Madagascar e na Rússia, foram isoladas cepas de *Y. pestis* com resistência a alguns antimicrobianos utilizados no tratamento da peste (cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, neomicina e minociclina) (Galimand *et al.*, 1997; Guiyoule *et al.*, 2001; SVS, 2008). O surgimento dessas cepas devido à aquisição natural de plasmídios de resistência preocupa a comunidade científica, visto que esta característica pode ser transmitida para outras cepas.

As abordagens tradicionais para combater uma infecção bacteriana baseiam-se no rompimento do ciclo de crescimento, impedindo a síntese e montagem de componentes-chave dos processos bacterianos, como a parede celular, a replicação do DNA e síntese proteica. Apesar de esses antimicrobianos serem altamente eficazes, eles resultam num estresse substancial sobre a bactéria-alvo, induzindo à rápida seleção de subpopulações resistentes (Walsh,

2003). No entanto, estratégias alternativas baseadas na inibição da virulência ao invés do crescimento bacteriano estão sendo investigadas (Kauppi *et al.*, 2003; Trachtman *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005; Moayeri *et al.*, 2006; Muschiol *et al.*, 2006; Veenendaal *et al.*, 2009). De acordo com Rasko e Sperandio (2010), tais abordagens devem oferecer uma pressão evolutiva leve, evitando o desenvolvimento de resistência, uma vez que os determinantes de virulência não são considerados essenciais para a sobrevivência das bactérias.

2.5. Controle e Prevenção

Segundo o Regulamento Sanitário Internacional, as atividades de vigilância devem ser rotineiras nas regiões consideradas pestíferas. Tais ações precisam ser ajustadas às condições particulares de cada foco, exigindo um estudo detalhado das áreas envolvidas e o conhecimento das suas características ecológicas e epidemiológicas. De acordo com a Nota Técnica publicada em 2007 pelo Ministério da Saúde, o Programa de Vigilância e Controle da Peste deve realizar monitoramento das áreas de foco basicamente pela vigilância sorológica de animais-sentinela (cães). Contudo, durante eventos de importância epidemiológica (casos humanos suspeitos/confirmados, alta positividade em carnívoros ou epizootia em roedores), é recomendada uma busca ativa na região (captura de roedores, pulgas e carcaças), que fornecerá melhores indicadores para o acionamento das medidas de controle (SVS, 2007).

Desde os anos de 1890 até 1999, os Estados Unidos utilizava uma vacina inativada (formalina) contra a peste, denominada USP, que apesar de oferecer proteção contra a forma bubônica, mostrava-se pouco eficiente contra a forma pneumônica primária (Russell *et al.*, 1995). Em 1936, Girard & Robic desenvolveram ainda uma vacina atenuada a partir da cepa EV76/Pgm-, contudo, graves efeitos colaterais foram associados à sua utilização (Russell *et al.*, 1995).

Em 2001, foi desenvolvida uma vacina recombinante a partir das proteínas antigênicas F1 (Fração 1) e V (antígeno de virulência) de *Y. pestis*, que

apresentou uma ótima proteção contra peste bubônica em camundongos e primatas não-humanos. Entretanto, assim com a vacina USP, sua imunidade celular é limitada, reduzindo sua eficácia na proteção contra a peste pneumônica (Amedei *et al.*, 2011). Além disso, a complexidade antigênica limitada dessa vacina recombinante, comparada à diversidade de cepas de *Y. pestis*, sugere que uma vacina atenuada poderia proporcionar uma proteção mais universal. Recentemente, foi desenvolvida uma vacina atenuada, potencialmente imunogênica, a partir da cepa mutante CO92 Δ yopH, cujo gene da proteína ativadora do Sistema de Secreção Tipo III (yopH) foi deletado (Bubeck & Dube, 2007). Sua eficácia em humanos ainda não foi testada.

A vacinação (USP) é recomendada apenas para indivíduos que estão continuamente expostos à situação de risco, como profissionais que trabalham em contato com roedores e manipulam cepas vivas. No entanto, devido a sua cobertura imunológica limitada, a vacinação pode representar um risco, por induzir ao vacinado uma falsa sensação de proteção (Almeida *et al.*, 2005). Sendo assim, as formas de prevenção da peste consistem basicamente na quimioprofilaxia dos profissionais de saúde, despulização periódica dos animais de estimação e programa de antirratização nas residências e silos (SVS, 2008).

2.6. Histórico

A história da peste é muitas vezes confundida com o próprio registro histórico da humanidade. Existem numerosas referências à peste em textos antigos, incluindo o Antigo Testamento (I Livro de Samuel). O primeiro registro de uma epidemia de peste ocorreu em Atenas, em 430-460 a.C., durante a guerra do Peloponeso, onde dizimou uma população estimada em 300 mil pessoas (Almeida *et al.*, 2005).

Durante a era cristã, foram bem caracterizadas três grandes pandemias (Figura 6). Entre os anos de 541-750 d.C., durante o governo do imperador romano Justiniano, ocorreu a *Primeira Grande Pandemia*, também denominada de Peste de Justiniano. Iniciou na África e disseminou-se por todo o mundo civilizado,

atingindo Ásia e Europa. Entre os anos 558 a 654 d.C. ocorreram epidemias periódicas, com uma frequência de oito a doze anos e estima-se que tenha provocado 100 milhões de mortes (Perry & Fetherston, 1997; Ligon, 2006; Khan, 2004; Prentice & Rahalison, 2007).

Os primeiros casos da *Segunda Grande Pandemia* iniciaram na Ásia e se estenderam por toda Europa e Norte da África. Esta pandemia, também conhecida como Peste Negra, ocorreu entre 1330-1346. Sua principal forma clínica foi a peste pneumônica, que dizimou mais de 25 milhões de pessoas na Europa entre os anos 1346 e 1352 (Perry & Fetherston, 1997).

A *Terceira Pandemia*, ou Pandemia Contemporânea, originou-se provavelmente na China. Estendeu-se para Hong Kong em 1894 e então se espalhou para os diversos continentes por meio de transporte marítimo, criando focos naturais em regiões do mundo até então indenes (Perry & Fetherston, 1997; Almeida *et al.*, 2005). Sua expansão teve fim com a Segunda Guerra Mundial, devido à substituição dos navios antigos por navios à prova de ratos (Almeida *et al.*, 2007).



Figura 6: Dispersão histórica das pandemias de peste. **A.** Primeira pandemia (542-602 d.C.), biovar *Antiqua*; **B.** Segunda pandemia (1347-1353), biovar *Medievalis*; **C.** Terceira pandemia (>1894), biovar *Orientalis*. (**Fonte:** Prentice & Rahalison, 2007)

A peste chegou ao Brasil em outubro de 1899 pelo porto de Santos, onde ocorreu o primeiro caso humano. Em seguida, atingiu várias cidades litorâneas (*Peste Portuária*), e penetrou pelas cidades do interior (*Peste Urbana*), onde foi eliminada por medidas sanitárias adequadas, mas fixou-se na zona rural (*Peste Silvestre*) entre os roedores silvestres. A partir de 1930, passou a atingir áreas rurais, com focos esparsos em pequenos distritos, fazendas e sítios, e finalmente assumindo o seu caráter de enzootia (WHO, 1965; Almeida *et al.*, 2005).

2.7. Situação Atual da Peste

Uma das características fundamentais da peste é a sua persistência nos focos, alternando fases de inatividade com epizootias. Segundo Bertherat (2010), os períodos de silêncio epidemiológico podem durar décadas até irromper uma epizootia, que se revela por mortandade entre os roedores e, frequentemente, por casos humanos esporádicos (Figura 7).



Figura 7: Reemergência da peste após períodos de silêncio epidemiológico. (Fonte: Bertherat, 2010)

Os mecanismos de sazonalidade da peste ainda não foram esclarecidos. Acredita-se que este fenômeno esteja associado a condições climáticas, permanência prolongada da *Y. pestis* nos vetores e nas tocas dos roedores e/ou infecção crônica em órgãos parenquimatosos de roedores resistentes (SVS, 2008). Dessa forma, a peste continua sendo uma ameaça.

Globalmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) notifica 1000-3000 casos de peste humana por ano (Figura 8).

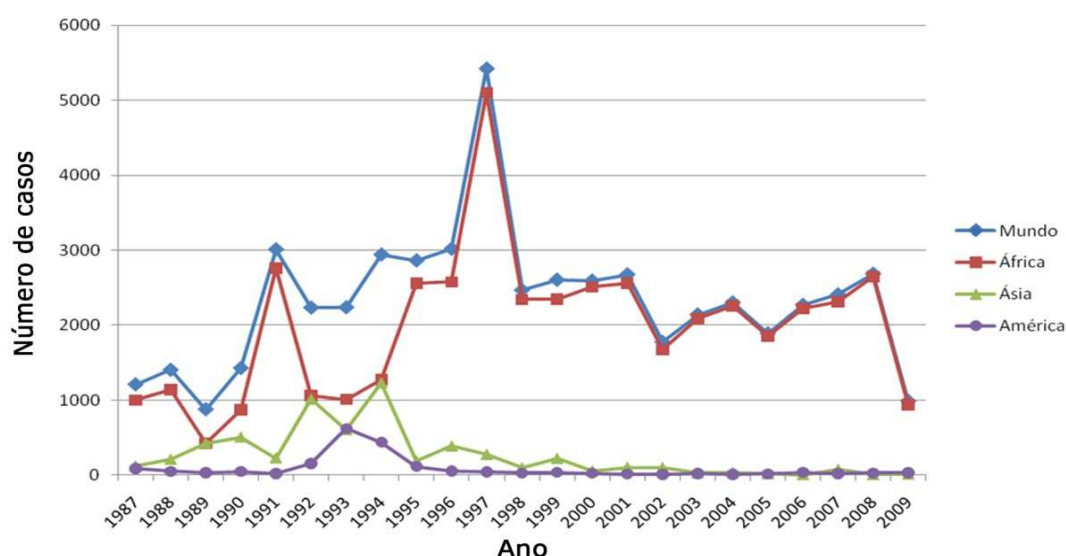


Figura 8: Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009 no mundo. (Fonte: WHO, 2010)

De 1999 a 2009, a OMS registrou desde casos esporádicos de peste humana e/ou animal, até surtos de peste bubônica e pneumônica, nas grandes áreas do mundo: África (Madagascar, República Democrática do Congo, Uganda, Tanzânia, Moçambique, Malawi, Líbia e Argélia); América (Estados Unidos, Peru e Brasil); e Ásia (Rússia, China, Índia, Indonésia, Cazaquistão, Mongólia e Vietnã) (Figura 9). Neste período, foram notificados 24.309 casos de peste humana em 20 países, sendo 1.822 fatais ($\approx 7.5\%$) (WHO, 2010). Nos EUA, principalmente nos Estados do Novo México, Colorado, Wyoming, Dakota do Sul, Arizona e Ilínois, 10-20 pessoas adquirem peste a cada ano, sendo 14% fatais (CDC, 2009).

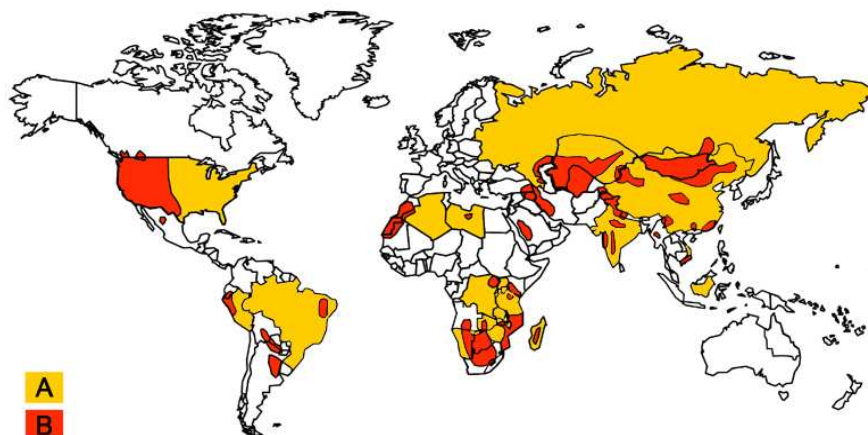


Figura 9: Distribuição da peste no mundo. **A.** Países com relato de peste humana entre 1999-2009; **B.** Prováveis focos de peste. (**Fontes:** A: WHO, 2010; B: CDC, 2005)

No Brasil, existem duas principais áreas de foco: o *Foco da Região Nordeste* e o *Foco da Serra dos Órgãos* (Figura 10). O *Foco do Nordeste* está localizado na Região semiárida do Polígono da Seca, que se estende do Estado do Ceará ao norte de Minas Gerais. O *Foco da Serra dos Órgãos* abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, no Estado do Rio de Janeiro (Almeida *et al.*, 2005; SVS, 2005).

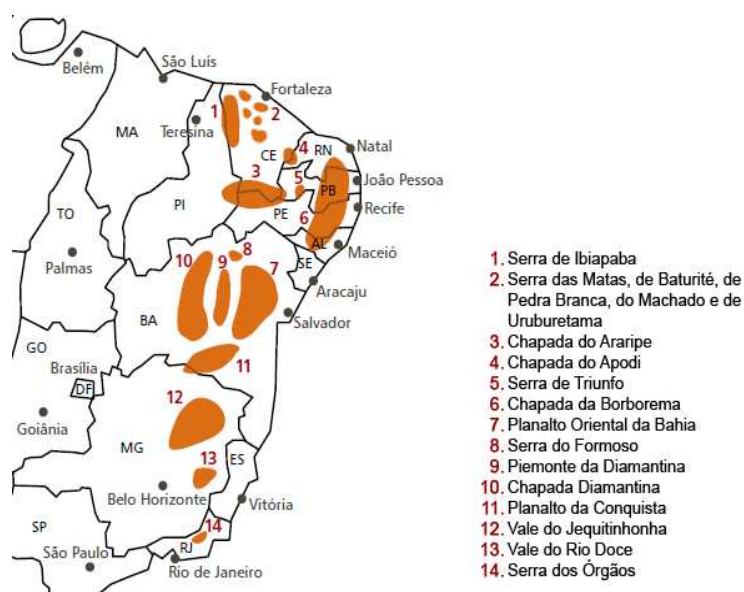


Figura 10: Principais áreas de foco da peste no Brasil. *Foco do Nordeste* (1 a 13) e *Foco da Serra dos Órgãos* (14). (**Fonte:** SVS, 2008)

A incidência de peste humana e a ocorrência de epizootias declinaram nas áreas de foco (Figura 11). O último surto de peste ocorreu em 1986, no Estado da Paraíba, além de casos isolados registrados nos Estados da Bahia na década de 1990 e no Ceará em 2005 (Almeida *et al.*, 1985, 1989, 2005; Aragão *et al.*, 2002; WHO, 2010). Entretanto, ainda é detectada atividade residual de peste nos animais-sentinela, exigindo vigilância permanente dos focos.

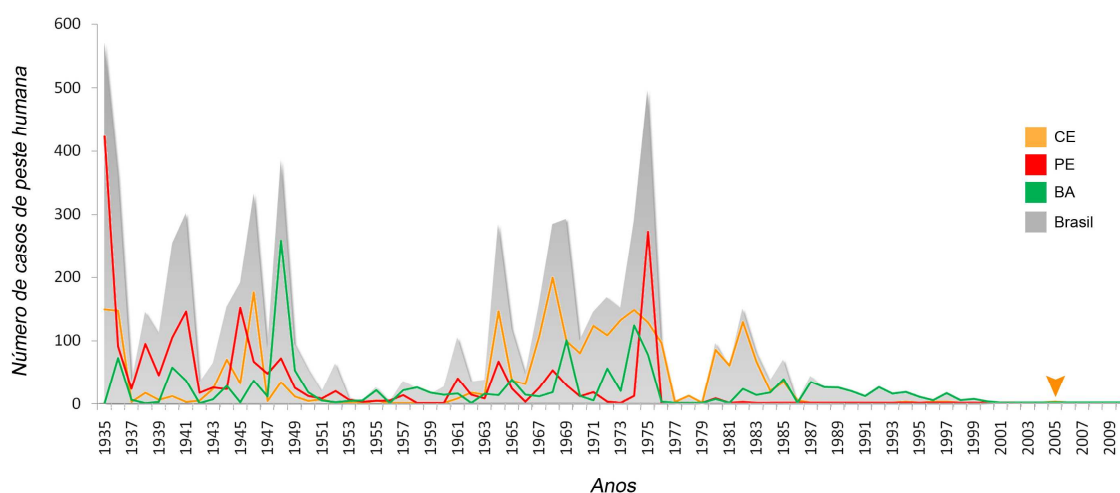


Figura 11: Distribuição do número de casos de peste humana registrados entre 1935 e 2010 no Brasil. Em destaque, os Estados do Ceará (CE), Pernambuco (PE) e Bahia (BA) que registraram o maior número de casos. A seta indica o último caso de peste humana ocorrido em 2005, no Estado do Ceará. (**Fontes:** Almeida *et al.*, 2005; SVS, 2008; SRP, 2011)

De acordo com o Regulamento Sanitário Internacional, uma região representa área de risco quando a positividade animal ultrapassa a prevalência de 1%. Entre 2005 e 2010, o Programa de Vigilância e Controle da Peste notificou 1927 animais-sentinela soropositivos para peste. No ano de 2005, o Estado do Ceará atingiu um percentual de positividade de 3.73%. Em 2007, este percentual diminuiu no Ceará (1.17%), mas aumentou em Pernambuco, atingindo 5.51% (Pereira *et al.*, 2011). Em 2009, os inquéritos sorológicos de Pernambuco detectaram positividade de 11.89% em carnívoros oriundos dos municípios de Bodocó, Calçado, Cedro, Serrita e Triunfo (Wanderlei *et al.*, 2011). Ainda nesse Estado, o Serviço de Referência Nacional em Peste registrou uma epizootia no

município de Cedro, nos meses de abril e maio de 2009, onde três lotes de pulgas e duas carcaças de roedores foram diagnosticadas positivas para peste através de PCR específica e imunofluorescência direta (Figura 12).

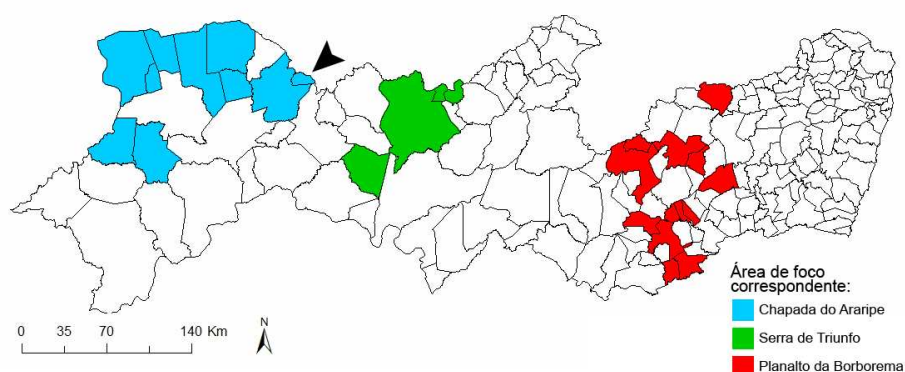


Figura 12: Municípios do Estado de Pernambuco com registro sorológico de peste entre 2005 e 2010. Seta indicando o município de Cedro, onde houve epizootia entre abril e maio de 2009. (Fonte: SRP, 2011)

Em 2000 e 2002, os focos do Rio Grande do Norte também representaram áreas de risco, pois a positividade de animais-sentinela atingiu 1.33% e 6.30%, respectivamente (Pereira & Vieira, 2010). A presença de focos ativos representa um risco permanente de envolvimento humano nas áreas onde a positividade animal persiste, tornando-se necessário uma vigilância ativa de casos humanos nessas regiões.

Há décadas não se tem notificação de casos de peste humana no Rio de Janeiro e em Minas Gerais, sendo ainda considerada rara a presença de anticorpos antipestosos nos animais-sentinela dessa região (Vieira & Coelho, 1998; SVS, 2005).

2.8. Evolução de *Yersinia pestis*

Análises de relógio molecular indicam que a ligação evolutiva *Y. pseudotuberculosis*-*Y. pestis* divergiu de *Y. enterocolitica* a 41-186 milhões de anos, enquanto *Y. pestis* divergiu de *Y. pseudotuberculosis* entre 1.5 e 20 mil anos

(Zhou & Yang, 2009). Estudos de genômica comparativa entre cepas de *Y. pestis* (CO92 - Parkhill *et al.*, 2001; KIM - Deng *et al.*, 2002; 91001 - Song *et al.*, 2004; Antiqua e Nepal - Chain *et al.*, 2006; D106004, Z176003 e D182038 - Shen *et al.*, 2010) e *Y. pseudotuberculosis* (IP32953: Chain *et al.*, 2004) revelaram alta similaridade entre as duas espécies, onde 75% das proteínas preditas apresentaram mais de 97% de identidade (Chain *et al.*, 2004).

Em determinada fase da história, mudanças ambientais devem ter levado a um drástico aumento na população de algum roedor, provavelmente a marmota (Suntsov & Suntsova, 2008). Nesse cenário competitivo e hostil, acredita-se que *Y. pseudotuberculosis* compartilhou reservatórios/vetores com outros patógenos, o que engatilhou a especiação de *Y. pestis*, através da transferência de genes de microrganismos ambientais ou do trato digestivo de pulgas. Ao mesmo tempo, ocorreram perdas e inativações gênicas aleatórias. Os eventos benéficos foram estabilizados através de herança vertical sob uma seleção direcional positiva. Segundo Zhou & Yang (2009), essa seleção Darwiniana permitiu ainda a aquisição de novos determinantes de virulência, decréscimo de funções redundantes ou deletérias e remodelagem nos mecanismos de regulação gênica, resultando no surgimento de *Y. pestis*.

A breve existência de *Y. pestis* como espécie distinta sugere que apenas um número limitado de mudanças genéticas tenha ocorrido para promover uma doença de caráter agudo (Achtman *et al.*, 1999). Ao comparar com o cromossomo de *Y. pseudotuberculosis*, Prentice & Rahalison (2007) e Zhou & Yang (2009) relacionam algumas particularidades no cromossomo de *Y. pestis*, tais como a transferência horizontal de genes (Ypfp, YPO0387 a YPO0396, YPO2087 a YPO2093), inativação (*yadA*, *inv*, *ureD*, *rcaA*, *nghA* e genes do antígeno O) e deleção gênica (*lpxL* e locos R1, R3, ORF2, ORF3 e ORF4). Contudo, a aquisição de dois plasmídios por *Y. pestis* foi catalisadora nas mudanças fenotípicas, possibilitando o abandono da via de transmissão entérica, permitindo a colonização de pulgas e transmissão entre hospedeiros mamíferos pela via subcutânea e pneumônica.

Por fim, a necessidade de uma alta septicemia ($\cong 10^8$ UFC/mL) para a transmissão do bacilo da peste do mamífero para a pulga induziu à seleção de uma espécie altamente virulenta (Oyston & Isherwood, 2002; Eisen & Gage, 2009).

2.9. Genoma de *Yersinia pestis*

2.9.1. Cromossomo

O cromossomo de *Y. pestis* compreende 4.750 ± 135 kb com 47,6% do conteúdo de GC, codificando 3.981 ± 165 proteínas (Figura 13).

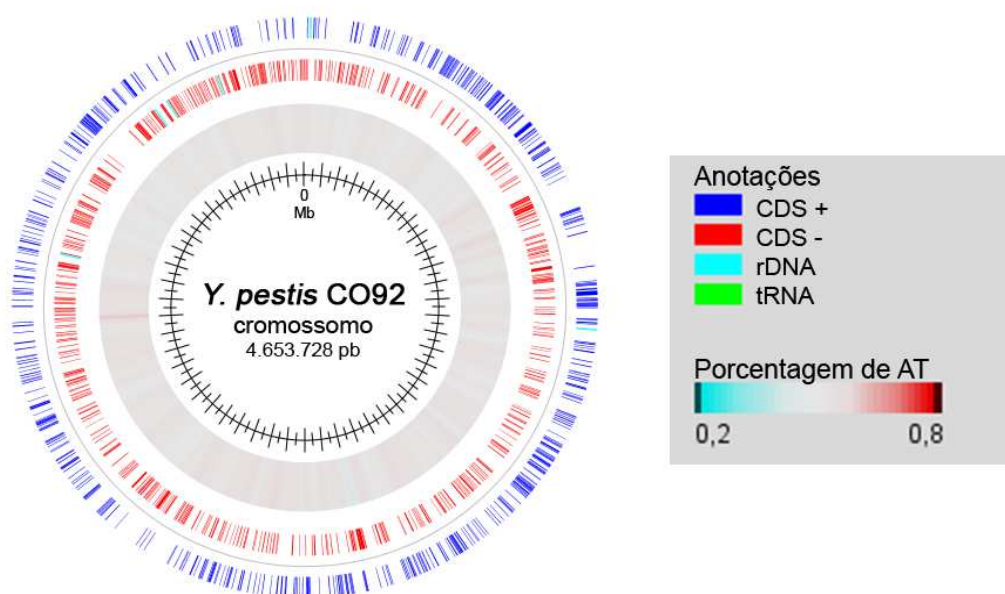


Figura 13: Representação do cromossomo da cepa CO92 de *Yersinia pestis*. (Fonte: Center for Biological Sequence Analysis, GeneWiz browser 0.94 server <<http://www.cbs.dtu.dk/services/gwBrowser/>>)

A expressão de seus genes é controlada por uma série de sistemas regulatórios comuns a muitas espécies bacterianas, como resposta estrigente à supressão de aminoácidos essenciais, resposta SOS a danos no DNA e proteínas

receptoras de AMPc que respondem a diferentes fontes de carboidrato (Perry & Fetherston, 1997). Entretanto, a maioria das pesquisas dos sistemas regulatórios de *Y. pestis* tem focado os genes envolvidos na sua virulência.

2.9.2. Plasmídios

Y. pestis possui três plasmídios prototípicos: pYV (\cong 70 kb), pFra (96-101 kb) e pPst (\cong 9.6 kb) (Parkhill *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2004). A ausência de algum desses plasmídios, bem como a presença de plasmídios atípicos (crípticos), já foi identificada em cepas de *Y. pestis* em todo mundo (Ferber & Brubaker, 1981; Chu *et al.*, 1998; Leal *et al.*, 2000; Leal-Balbino *et al.*, 2004).

Mudanças no perfil plasmidial podem ser resultado da deleção (cura), multimerização ou recombinação dos plasmídios prototípicos (Leal *et al.*, 1997; Perry & Fetherston, 1997). Muitas cópias de sequências de inserção (IS) presentes nos três plasmídios propiciam esses eventos de recombinação, organização gênica e inserção ao cromossomo (Filippov *et al.*, 1995; Parkhill *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2002).

2.9.2.1. pYV

O pYV (plasmídio associado à virulência das yersínias), também chamado pCD1 (por codificar proteínas dependentes do Cálcio), é indispensável à virulência de *Y. pestis* e está presente nas outras yersínias patogênicas (Butler, 2009) (Figura 14). O papel principal deste plasmídio é prevenir a fagocitose, garantindo a sobrevivência e multiplicação do bacilo *in vivo*.

Seus genes podem ser divididos em três grupos funcionais: adesão bacteriana às células-alvo eucarióticas; injeção de proteínas efetoras no citosol através de um injectiossomo (Sistema de Secreção Tipo III); e alteração de várias funções nas células eucarióticas (ruptura do citoesqueleto para inibir a fagocitose, apoptose de macrófagos, inibição na produção de citocina pelos linfócitos T,

redução na expressão de B7.2 na superfície de linfócitos B ativos e inibição da resposta inflamatória em diversos tipos celulares) (Straley, 1993; Carniel, 2008).

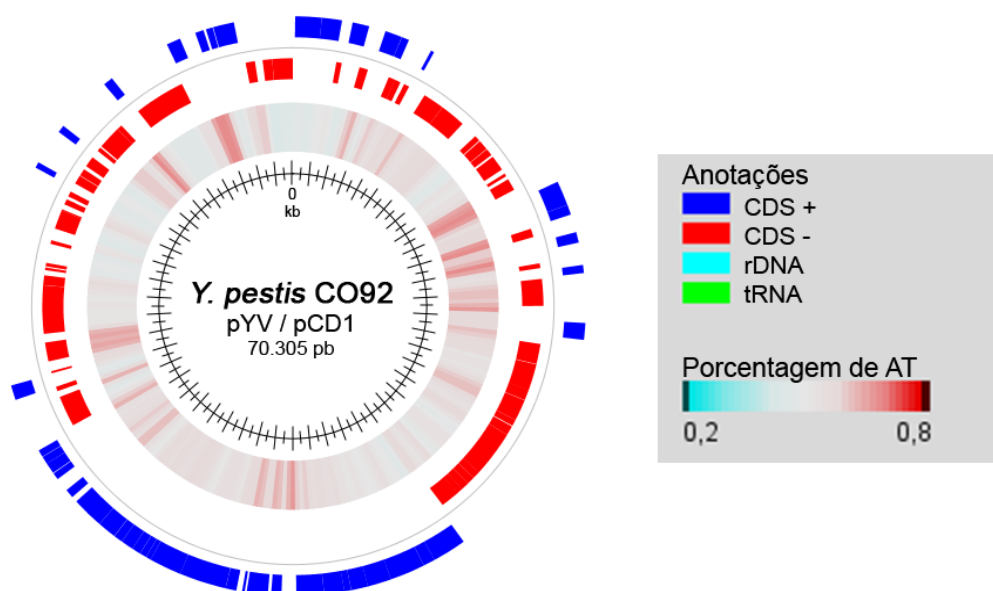


Figura 14: Representação do plasmídio pYV/pCD1 da cepa CO92 de *Yersinia pestis*. (Fonte: Center for Biological Sequence Analysis, GeneWiz browser 0.94 server <<http://www.cbs.dtu.dk/services/gwBrowser/>>)

O conteúdo de GC do pYV (44.8%) é menor que o conteúdo de GC cromossômico (47-48%) e com distribuição heterogênea. Esta característica, associada à presença de sequências de inserção (parciais ou completas) e diferentes organizações gênicas entre as yersínias patogênicas, sugerem uma história complexa de aquisição de DNA, com deleções, inserções, translocações e rearranjos internos do pYV (Chu *et al.*, 1998; Perry *et al.*, 1998).

2.9.2.2. pFra

O pFra (plasmídio que codifica a proteína antigênica Fração 1), também é denominado pMT1 (por codificar a toxina murina, atualmente conhecida como fosfolipase D), é um dos plasmídios exclusivos da *Y. pestis* (Figura 15), sendo indispensável para transmissão do bacilo pela pulga (Almeida *et al.*, 2003).

Carrega $\cong 115$ genes putativos, dos quais 38% não apresentam homologia significativa com as sequências depositadas em bancos de dados. Outras ORFs são homólogas aos genes envolvidos no metabolismo ou regulação de DNA e proteínas. Também são encontrados vários genes de mobilidade (integrases, transposases, resolvases, IS e sequências de fago) (Carniel, 2008).

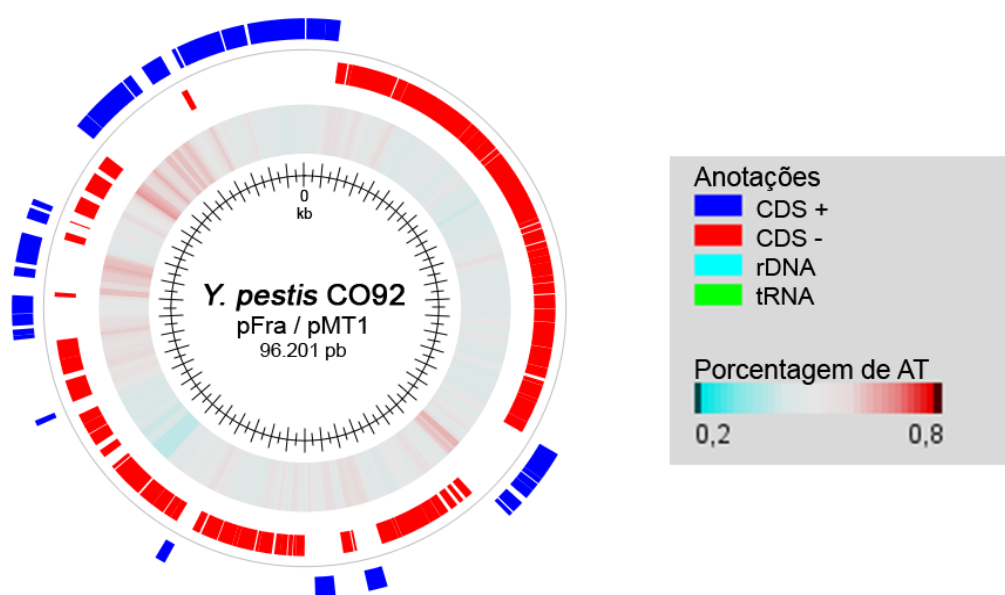


Figura 15: Representação do plasmídeo pFra/pMT1 da cepa CO92 de *Yersinia pestis*. (Fonte: Center for Biological Sequence Analysis, GeneWiz browser 0.94 server <<http://www.cbs.dtu.dk/services/gwBrowser/>>)

Apesar do seu conteúdo de GC ser próximo ao cromossomal (50.2%), algumas regiões apresentam conteúdo muito baixo (38-39%), sugerindo uma estrutura em mosaico de diferentes elementos genéticos. Além disso, a organização dos seus genes não é conservada entre diferentes cepas de *Y. pestis* (Lindler, 2004). A integração do pFra ao cromossomo parece ser frequente, podendo ocorrer em vários locais de inserção, resultando ou não na perda de função dos seus genes (Protsenko *et al.*, 1991; Filippov *et al.*, 1995; Parkhill *et al.*, 2001; Leal-Balbino *et al.*, 2004).

Em 2001, foi identificado um isolado clínico de *Salmonella enterica* sorovar typhi carregando um plasmídeo (pHCM2) que continha 62 ORFs em comum com o

pFra. As regiões em comum dos dois plasmídios apresentava um conteúdo de GC mais próximo ao cromossomo de *S. enterica*, sugerindo que esta tenha sido a espécie doadora do pFra para *Y. pestis* (Prentice *et al.*, 2001).

2.9.2.3. pPst

O segundo plasmídio específico de *Y. pestis* é denominado pPst (plasmídio que codifica a pesticina), pCP1 (pela atividade de coagulase e ativadora do plasminogênio) ou ainda pPla (por codificar o ativador do plasminogênio) (Figura 16).

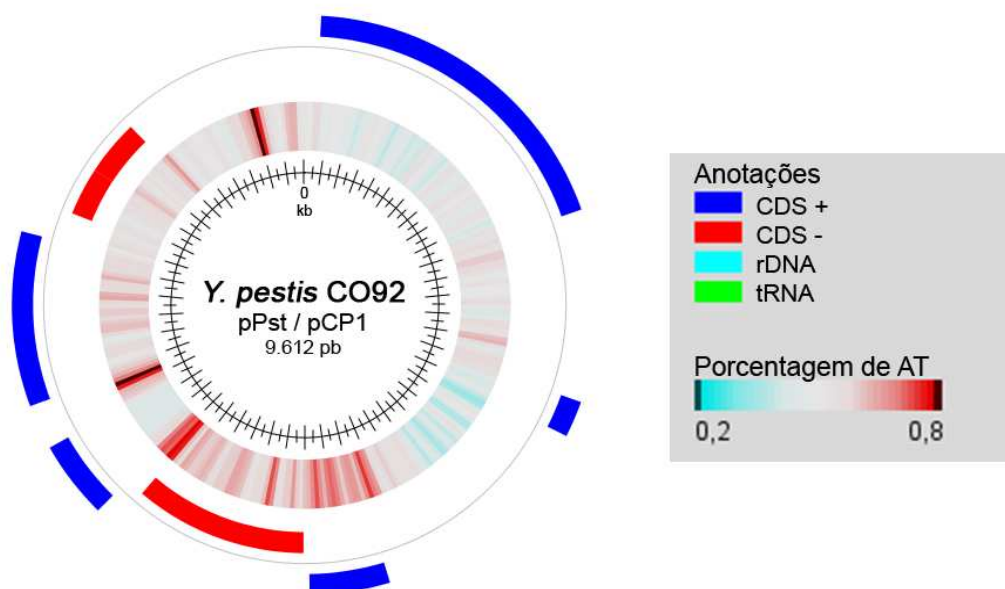


Figura 16: Representação do plasmídio pPst/pCP1 da cepa CO92 de *Yersinia pestis*. (Fonte: Center for Biological Sequence Analysis, GeneWiz browser 0.94 server <<http://www.cbs.dtu.dk/services/gwBrowser/>>)

O tamanho, organização gênica e conteúdo de GC (45.3%) do pPst parecem ser invariáveis entre diferentes cepas de *Y. pestis*, entretanto este plasmídio pode estar presente em múltiplas cópias no genoma (Perry & Fetherston, 1997; Prentice & Rahalison, 2007). Além de carregar genes que codificam a proteína ativadora do plasminogênio, a bacteriocina pesticina e sua proteína de imunidade, o pPst possui seis ORFs para transposase IS100.

Aparentemente, sua aquisição facilitou a disseminação da bactéria a partir do local da picada da pulga, não influenciando no aumento da patogenicidade de *Y. pestis* (Kutyrev *et al.*, 1999; Pouillot *et al.*, 2005).

Apesar de não ter sido isolado em nenhuma outra espécie, vários membros da família Enterobacteriaceae possuem genes homólogos ao ativador do plasminogênio (Carniel, 2008).

2.10. Determinantes de virulência

Determinantes de virulência são fatores que auxiliam no processo de invasão/disseminação da bactéria no hospedeiro e/ou na sua transmissão, contribuindo diretamente com a aderência à célula eucariótica, rompendo o metabolismo celular, adquirindo nutrientes essenciais ou bloqueando suas respostas defensivas (Prentice & Rahalison, 2007). A virulência de *Y. pestis* é plurifatorial, visto que os fatores de virulência desta espécie são codificados no cromossomo e nos três plasmídios prototípicos (Deng *et al.*, 2002; Parkhill *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004) (Figura 17).

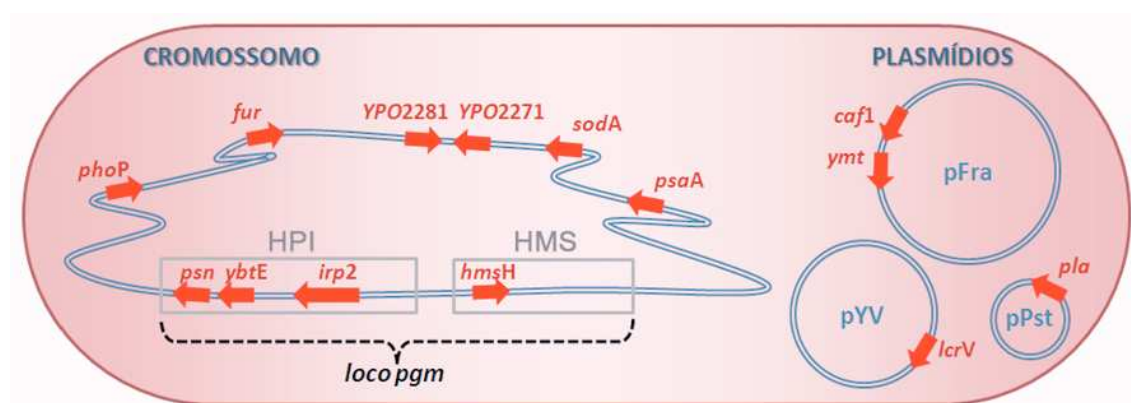


Figura 17: Esquema representativo do genoma de *Yersinia pestis*, indicando a localização dos principais genes associados à virulência.

2.10.1. Loco *pgm*

No cromossomo das yersínias patogênicas existe uma região de 102 kb conhecida como loco *pgm*, relacionada à virulência e a captação de ferro (Fetherston *et al.*, 1992). Este loco contém dois segmentos físicos e funcionalmente distintos: uma ilha de alta patogenicidade (HPI), associada à aquisição de ferro; e uma região de estocagem de hemina (*hms*) associado à pigmentação e produção de biofilme (Buchrieser *et al.*, 1998; Prentice & Rahalison, 2007).

Y. pestis não é capaz de produzir um pigmento próprio. Entretanto, uma vez que o loco *pgm* permaneça íntegro, a bactéria pode adsorver, a 26°C, grandes quantidades de hemina exógena, ou corantes análogos, como o Vermelho Congo, resultando no fenótipo avermelhado das colônias, classificadas como Pgm+ (Buchrieser *et al.*, 1998). Este teste é empregado na identificação de cepas virulentas (Pgm+, colônias vermelhas) e avirulentas (Pgm-, colônias brancas).

A deleção do loco *pgm* resulta na diminuição da eficiência na utilização da pulga como vetor e perda de virulência em camundongos, devido à incapacidade em absorver ferro no mamífero hospedeiro. Contudo, se cepas Pgm- forem inoculadas *in vivo* com ferro livre (ou hemina), elas tornam-se capazes de desenvolver a doença. Similarmente, cepas Pgm- não conseguem crescer *in vitro* a 37°C em meios com ferro quelado (Bearden *et al.*, 1997).

2.10.1.1. HPI

Ilhas de patogenicidade representam um grupo específico de elementos móveis encontrados no cromossomo de diversas espécies bacterianas, conferindo propriedades patogênicas específicas à cepa hospedeira (Hacker *et al.*, 1997). Esses elementos apresentam algumas características que permitem diferenciá-los do genoma hospedeiro: encontram-se inseridos em genes de tRNA; são flanqueados por sequências repetitivas curtas; possuem um conteúdo de GC diferente do resto do genoma; codificam uma integrase semelhante ao fago; e possuem potencial para excisão espontânea.

Duas ilhas de patogenicidade foram identificadas no cromossomo das yersínias patogênicas: a Ilha de Alta Patogenicidade (HPI, *high-pathogenicity island*) e a Ilha de Adesão e Patogenicidade de Yersínia (YAPI, *yersinia adhesion pathogenicity island*). Enquanto a YAPI está presente apenas em *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, a HPI está presente em todas as espécies patogênicas do gênero *Yersinia* e numa grande variedade de gêneros bacterianos (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Photobacterium* e *Serratia*) (Carniel, 2008).

O ferro serve como um cofator essencial em um grande número de reações metabólicas e enzimáticas. Os patógenos bacterianos dependem da habilidade de invadir e de adquirir ferro para garantir seu sucesso no estabelecimento da doença num organismo hospedeiro (Bearden *et al.*, 1997). Em mamíferos, o ferro está ligado a proteínas eucarióticas (hemoglobina, ferritina, transferrina e lactoferrina), o que mantém um nível de ferro livre muito baixo (10^{-8} M) para o crescimento bacteriano (Carniel, 2001). Sendo assim, quelantes férricos de baixo peso molecular, denominados sideróforos, são usados por muitas bactérias para superar essa deficiência.

Yersínias altamente patogênicas secretam seu sideróforo, yersiniabactina, o qual quela moléculas de ferro ligadas a proteínas eucarióticas, transportando-as de volta à bactéria (Bearden *et al.*, 1997). Essa molécula pequena (482 Da) é formada por um mecanismo complexo de síntese peptídica não-ribossomal, cuja montagem modular deriva de salicilato, um resíduo de malonil-coenzima A, três moléculas de cisteína e três grupamentos metila (Gehring *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 2004; Carniel, 2001).

A HPI de *Y. pestis* carrega 11 genes (divididos em quatro operons), sendo dois envolvidos na biossíntese, um no transporte e outro na regulação da yersiniabactina. Esses genes são denominados *irp* (proteínas reguladas pelo ferro), *ybt* (yersiniabactina) e *psn* (receptor da pesticina/yersiniabactina) (Carniel, 1999) (Figura 18).

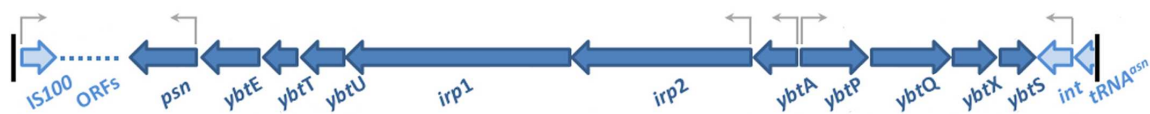


Figura 18: Estrutura canônica da Ilha de Alta Patogenicidade (HPI) de *Yersinia pestis*. (Fonte: Carniel, 2001)

Os genes envolvidos na síntese são: *ybtE* (salicil-AMP ligase), *irp2* (peptídeo sintetase), *irp1* (peptídeo/poliquetídeo sintetase), *ybtS* (síntese de silicilato) e *ybtT* (tioesterase). Já os *psn* (receptor externo da membrana), *ybtP* e *ybtQ* (permeases internas da membrana) são responsáveis pelo transporte do ferro para o citosol bacteriano. Não está claro ainda se a yersiniabactina é concomitantemente internalizada durante este processo (Bearden *et al.*, 1997; Carniel, 2001). Os genes *ybtX* e *ybtU* não possuem função esclarecida (Carniel, 1999). A transcrição dos genes *irp2*, *irp1*, *ybtU*, *ybtT* e *ybtE* ocorre num único RNA policistrônico de ≈ 19.2 kb (Bearden *et al.*, 1997; Carniel, 2001).

O *ybtA* é responsável pela regulação da HPI, codificando um ativador transcricional da família AraC. A HPI ainda é regulada negativamente pela proteína do gene *fur* e positivamente pela própria yersiniabactina (Bearden *et al.*, 1997; Carniel, 1999).

2.10.1.2. HMS

O segundo segmento do loco *pgm*, denominado HMS (*hemin storage*), é composto por cinco genes divididos em dois operons (*hmsHFRS* e *hmsT*). Esses genes, envolvidos na adsorção de hemina (Perry & Fetherston, 1997; Darby, 2008), são transcritos independentemente da quantidade de ferro, temperatura ou mesmo de autorregulação. Entretanto, a ação de suas proteínas *in vitro*, resultando no fenótipo Pgm+, só é evidente nas cepas cultivadas à 26°C. Aparentemente, isso ocorre por conta de um mecanismo de regulação pós-transcricional, uma vez que as proteínas HmsH, HmsR e HmsT são sensíveis a altas temperaturas (Perry *et al.*, 2004).

O trato digestivo de pulgas infectadas com *Y. pestis* é bloqueado (total ou parcialmente) pela formação de biofilme, regulada pelos genes *hms*, o que os tornam essenciais para transmissão da peste pelo artrópode (Perry *et al.*, 2004; Darby, 2008) (Figura 19).

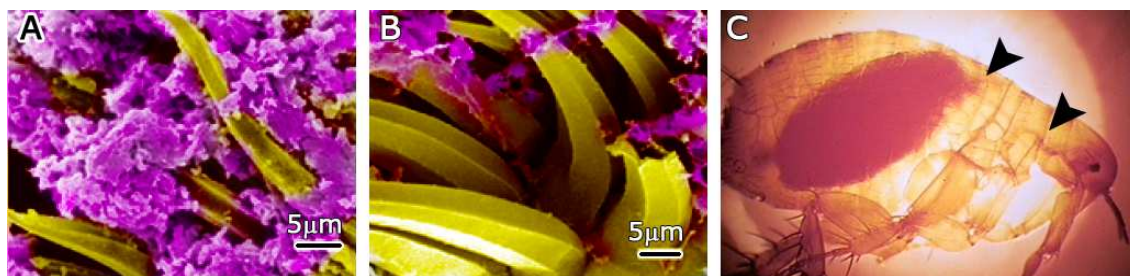


Figura 19: Ação do biofilme de *Yersinia pestis* na pulga (*Xenopsylla cheopsis*). **A.** Eletromicrografia de varredura das espículas do proventrículo colonizadas por cepas *hms*⁺; **B.** Ineficiência na colonização da pulga por cepas *hms*⁻; **C.** Pulga infectada com trato digestivo bloqueado (setas). (Fontes: A e B: Darby, 2008; C: CDC)

Estudos dos genes *hms*, utilizando o nematóide *Caenorhabditis elegans* como animal modelo, identificaram sua importância na formação de biofilme apenas na superfície do verme. Contudo, cepas *hms*⁻ podem eventualmente matar *C. elegans* através de mecanismos que diferem do bloqueio na ingestão de alimentos (Darby *et al.*, 2002; Tan & Darby, 2004; Styer *et al.*, 2005). Provavelmente, outros fatores de patogenicidade (expressos a 25°C) atuam neste processo (Styer *et al.*, 2005).

2.10.2. *fur*

Em muitas bactérias, a regulação da absorção do ferro é mediada por um repressor altamente conservado codificado pelo gene *fur* (*ferric uptake regulation*). Na presença de ferro livre, o regulador Fur age como um repressor forte de transcrição, ligando-se a regiões promotoras e bloqueando a ação da RNA polimerase (Bearden *et al.*, 1997). As regiões operadoras dos quatro operons da HPI (promotores dos genes *psn*, *irp2*, *ybtP* e inclusive do ativador *ybtA*) possuem um sítio de ligação para a proteína *fur* (Carniel, 2001) (Figura 20). A forte

regulação da HPI é importante para *Y. pestis*, uma vez que cepas *fur*- podem morrer intoxicadas pelo acúmulo de ferro, devido à superexpressão do seu sideróforo (Perry & Fetherston, 1997).

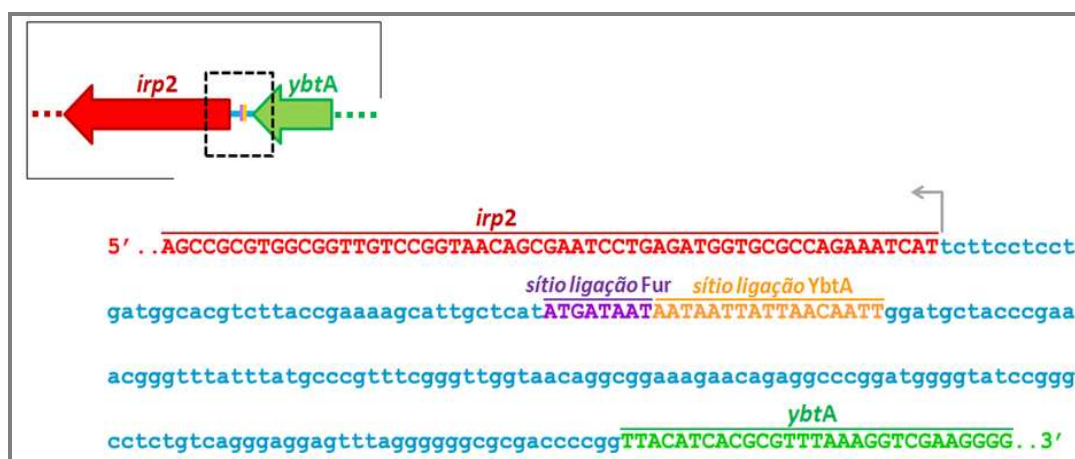


Figura 20: Região intergênica *irp2/ybtA* de *Yersinia pestis*, destacando o sítio de ligação para o repressor de transcrição Fur na região operadora do *irp2*.

2.10.3. YpfΦ

Recentemente foi identificada uma região cromossômica de 8.7 kb homóloga a um profago filamentoso, denominada YpfΦ (*Y. pestis* filamentous phage), adquirida por *Y. pestis* após sua divergência evolutiva de *Y. pseudotuberculosis*. Essa região contém 13 ORFs funcionais envolvidas na replicação, encapsidação e secreção do fago. Entretanto, foram encontradas quatro ORFs de função desconhecida nas extremidades do YpfΦ (Derbise *et al.*, 2007). Sua presença não interfere na eficiência da transmissão, mas aparentemente é importante para crescimento *in vivo* durante o processo infeccioso, por mecanismos ainda desconhecidos (Carniel, 2008).

2.10.4. *sodA*

As bactérias respondem ao estresse oxidativo gerado pela atividade de macrófagos e neutrófilos através de duas vias regulatórias principais: ativação

oxidativa do regulador transcricional OxyR e indução de superóxido dismutases (sod) pelo sistema regulatório SoxRS. Em *Y. pestis*, apenas o *sodA* apresenta altos níveis de expressão no bubão, evitando o estresse oxidativo exógeno e implicando numa resposta protetora ao peroxinitrito (ONOO⁻), derivado de alguns agentes antimicrobianos (Revell & Miller, 2001). Apesar de o *sodA* ser essencial para a virulência de *Y. enterocolitica*, sua perda em *Y. pestis* não aumenta a DL₅₀ ou a taxa de sobrevivência em ratos infectados, resultando apenas no aumento do período de incubação da doença (Sebbane *et al.*, 2006).

2.10.5. *psa*

O antígeno pH6 (pH6-Ag ou Psa) foi primeiramente descrito em 1961 sendo inicialmente identificado como um antígeno expresso somente a um pH abaixo de 6 a 37°C (Ben-Efraim *et al.*, 1961). O gene *psa* é responsável pela síntese *in vivo* de uma estrutura semelhante à fibrilina de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (Perry & Fetherston, 1997).

Em *Y. pestis*, o Psa liga-se com alta afinidade a lipoproteínas e LDL plasmático do hospedeiro vertebrado. Aparentemente, esta ligação com os constituintes plasmáticos previne a interação da bactéria com as células do hospedeiro e também dificulta o reconhecimento do patógeno pelas células do sistema imune (Makoveichuck *et al.*, 2003). Essa propriedade independe de outros fatores reconhecidamente antifagocitários, como as Yops e o antígeno F1 (Huang *et al.*, 2004). Além disso, Galván *et al.* (2007) demonstraram que o pH6-Ag liga-se ao líquido surfactante pulmonar que cobre a superfície alveolar, indicando a importância deste antígeno no desenvolvimento da forma pneumônica da peste.

2.10.6. LOS

Como toda Gram-negativa, a camada de lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da membrana externa. Esta estrutura parece mediar resistência a componentes do complemento e anticorpos, provavelmente através

de ligações aberrantes do complexo de ataque à membrana (Perry & Fetherston, 1997). Regulada por genes cromossômicos, esta estrutura é constituída basicamente por uma âncora de lipídio A, uma base de oligossacarídeo e um polissacarídeo antigênico-O (Bruneteau & Minka, 2003).

Yersínias entéricas possuem LPS típicos envolvendo sua superfície, enquanto *Y. pestis* tem apenas lipooligossacarídeo (LOS), uma vez que sua estrutura é incompleta (sem cadeias O-específicas) (Oyston & Isherwood, 2002). Aparentemente a inativação (mudanças na fase de leitura) do cluster gênico do antígeno-O foi benéfica para a virulência do agente da peste (Revell & Miller, 2001).

Além de modificações no antígeno-O, o lipídio A de *Y. pestis* foi remodelado, tornando-se menos acilado e menos tóxico. Esta propriedade permite que a bactéria, ao abandonar o interior dos macrófagos, atinja altos níveis de bacteremia prolongada, sem causar choque endotóxico ou morte imediata do hospedeiro, permitindo sua transmissão para a pulga (Prentice & Rahalison, 2007; Butler, 2009).

2.10.7. *phoP*

Em bactérias, a forma mais rápida e eficiente de adaptação transcricional a sinais extracelulares ocorre através de sistemas baseados na fosfo-transferência entre domínios proteicos, geralmente transmembrana, associados a receptores citoplasmáticos com função de regulação gênica (Marceau, 2005). Estes sistemas de molécula quinase-sensora e molécula de resposta regulatória são geralmente dispostos em pares cognatos, chamados de sistemas regulatórios de dois componentes (*Two Component Systems*, TCSs) (Oyston *et al.*, 2000; Marceau, 2005).

Ao analisar a dinâmica da infecção de *Y. pestis* no baço de camundongos, foi identificado que nos estágios iniciais da infecção, neutrófilos esplênicos restringem o crescimento da bactéria, enquanto macrófagos esplênicos servem de abrigo para multiplicação intracelular de *Y. pestis*, escapando no final da infecção.

Essa multiplicação no interior dos macrófagos é uma propriedade compartilhada com *Y. pseudotuberculosis* e *Salmonella enterica*, sob o controle das proteínas PhoQ e PhoP (um dos sistemas TCSs), que funcionam, respectivamente, como quinase-sensora e regulador de resposta, revelando a importância destas proteínas na patogênese da bactéria (Grabenstein *et al.*, 2006).

2.10.8. *caf1*

O gene *caf1* (*capsular antigen Fraction 1*), localizado no pFra, codifica o antígeno F1. Com expressão máxima a 37°C, este antígeno forma uma cápsula ou envelope semelhante a um gel, devido à formação de polímeros de F1, que chegam a atingir muitos megadaltons (Chen & Elberg, 1977; Perry & Fetherston, 1997) (Figura 21). Esses polímeros são formados por dezenas a centenas de dímeros de F1, com centro hidrofóbico, ligados por pontes de hidrogênio.

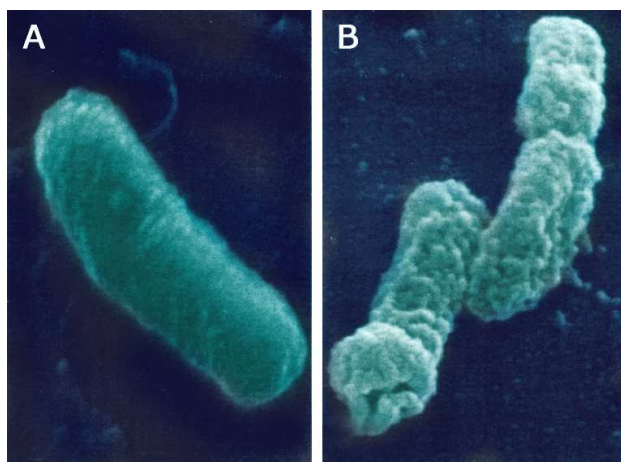


Figura 21: Eletromicrografia de varredura de *Yersinia pestis* mostrando a regulação térmica na expressão do polímero de F1. **A.** Células cultivadas à 28°C, 62000X; **B.** Células cultivadas à 37°C, 40000X. (Fonte: Chen & Elberg, 1977)

Esta estrutura capsular está envolvida na resistência à fagocitose em sinergia com as proteínas LCRS (Prentice & Rahalison, 2007), descritas adiante. Por ser um antígeno altamente imunogênico e específico de *Y. pestis*, a detecção de anticorpos anti-F1 serve de base para a maioria dos testes sorológicos. Cepas

caf1- podem apresentar ou não uma moderada perda da virulência em ratos e cobaias (Perry & Fetherston, 1997; Prentice & Rahalison, 2007).

2.10.9. *ymt*

Este gene plasmidial (pFra) codifica uma proteína de 61 kDa, capaz de formar polímeros de 120 ou 240 kDa. Seu nome, *ymt* (*yersinia murine toxin*), provém da sua atividade tóxica em camundongos e ratos. Contudo, a DL₅₀ em camundongos inoculados com cepas *ymt*- praticamente não é afetada (Perry & Fetherston, 1997).

A Ymt é expressa preferencialmente a 26°C, mostrando-se importante no processo de colonização da bactéria na pulga. Acredita-se que esta proteína, altamente homóloga à fosfolipase D de *Streptomyces antibioticus*, previna/bloqueie o mecanismo de autólise bacteriana provocada por subprodutos do plasma sanguíneo digerido no trato digestivo da pulga, sendo, portanto, essencial para transmissão (Hinnebusch, 2005).

2.10.10. LCRS

Ao abandonar o interior dos macrófagos, o principal triunfo das yersínias patogênicas foi a habilidade de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, como fagocitose e indução da resposta inflamatória por macrófagos e neutrófilos no meio extracelular. Essa resistência foi adquirida pela capacidade em injetar proteínas efetoras (Yops e Antígeno V) dentro das células de defesa do hospedeiro vertebrado (Kopp & Medzhitov, 2002).

O conjunto de genes plasmidiais (pYV), denominado LCRS (*low-calcium response stimulon*), são expressos ao máximo a 37°C e sob baixas concentrações de Cálcio ou nucleotídeos exógenos. Este complexo gênico codifica o antígeno V (*lcrV*), as proteínas externas de yersínia (*Yop*, *yersinia outer proteins*) e a maioria dos elementos que compõem o Sistema de Secreção Tipo III (Perry & Fetherston, 1997).

Aparentemente, YopDB auxiliam a translocação de outras Yops. YopEHJMOT atuam dentro da célula do hospedeiro, interferindo na fagocitose, inibindo o ataque oxidativo antimicrobiano, inibindo produção de citocinas inflamatórias e promovendo apoptose. A ação dessas Yops permite que a bactéria sobreviva e se multiplique no fígado, baço e tecidos linfáticos do hospedeiro (Kopp & Medzhitov, 2002; Almeida *et al.*, 2003).

Além de ser secretado, o antígeno V induz a expressão dos operons LCRS e atua na translocação das Yops (Perry & Fetherston, 1997). No hospedeiro, este antígeno induz a produção de IL-10, o que desacelera a resposta imune inata (Kopp & Medzhitov, 2002). Portanto, a presença desses fatores de virulência é essencial para o desenvolvimento da doença, mas não é suficiente para que ocorra a transmissão pela pulga (cepas pPst- e pFra-) (Almeida *et al.*, 2003).

2.10.11. *pla*

A proteína ativadora do plasminogênio (34.6 kDa), codificada pelo gene *pla* no plasmídio pPst, atua como uma coagulase a temperaturas abaixo dos 30°C. Dessa forma, a proteína Pla foi inicialmente considerada importante no bloqueio do trato digestivo da pulga (Oyston, 2001). Contudo, cepas desprovidas do gene *pla* ainda são capazes de bloquear o proventrículo de pulgas (Hinnebusch *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2003).

Em temperaturas superiores a 30°C, esta proteína possui atividade fibrinolítica, provavelmente por modificações pós-traducionais, sendo considerada importante na disseminação da bactéria a partir do local da picada da pulga. Consequentemente, cepas *pla*- inoculadas pela via subcutânea causam apenas uma infecção localizada (Perry & Fetherston, 1997; Oyston, 2001).

Proteases de superfície, como a Pla, podem estar envolvidas ainda na resistência sérica (Oyston, 2001) e no desenvolvimento da peste pneumônica primária (Latham *et al.*, 2007; Titball & Oyston, 2007).

2.10.12. *pst* e *pim*

Localizados no plasmídio pPst, esses genes estão envolvidos com a síntese (*pst*) e imunidade (*pim*) à bacteriocina de *Y. pestis*, denominada pesticina. Aparentemente, esses genes não são essenciais para transmissão do bacilo pestoso pela pulga (Almeida *et al.*, 2003). O receptor da pesticina (Psn) é codificado na HPI, dessa forma, cepas *pim*⁻ são sensíveis à pesticina, enquanto cepas Pgm⁻ e *pim*⁻ são capazes de se desenvolver normalmente (Buchrieser *et al.*, 1998; Prentice & Rahalison, 2007).

2.11. Epidemiologia molecular de *Y. pestis*

Análises epidemiológicas são importantes para determinar a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença. A exata identificação do patógeno é requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre as populações estudadas. Segundo Tenover *et al.* (1995), sistemas apropriados de tipagem são necessários para analisar a estrutura genética dos isolados bacterianos, permitindo estabelecer relação entre eles e elaborar estratégias efetivas de controle epidemiológico.

Diferentes técnicas moleculares têm sido descritas e aprimoradas para identificação e comparação de cepas de *Y. pestis*. Dentre elas, encontram-se aquelas baseadas em PCR, como RAPD (polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente) (Leal, 1998), PCR-Ribotipagem (polimorfismo da região espaçadora 16S-23S do rDNA) (Guiyoule *et al.*, 1994), RFLP-IS (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição das sequências de inserção) (Huang *et al.*, 2002) e MLVA (análise de múltiplos locos com número variável de repetições em tandem) (Li *et al.*, 2009; Vogler *et al.*, 2011). Outras técnicas de tipagem baseam-se na macrorrestrição genômica (PFGE - eletroforese em gel de campo pulsado) (Huang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009) ou no sequenciamento de locos específicos, como a análise dos locos CRISPR (grupos de repetições palindrômicas curtas regularmente interespçadas) (Cui *et al.*, 2008) e a detecção

de SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) em locos pré-estabelecidos (Touchman *et al.*, 2007; Vogler *et al.*, 2011).

A subtipagem molecular de *Y. pestis* para rastreamento epidemiológico é difícil devido à grande similaridade genética da espécie (Vogler *et al.*, 2011). Além disso, no Brasil, há um consenso geral de que houve apenas uma entrada da peste, apontando para a origem monoclonal desses isolados (Almeida *et al.*, 2005). Entretanto, registros do início da história da peste no Brasil são descontínuos e esparsos, tornando um acompanhamento detalhado difícil ou impossível, pois a notificação sistemática tornou-se obrigatória somente após a década de 1930 (Pollitzer, 1954; Baltazard, 1968). Dessa forma, acredita-se que possa ter havido mais de uma entrada da peste no Brasil (Tavares, 2007).

No departamento de Microbiologia do CPqAM/Fiocruz, foram realizadas tentativas para genotipar os isolados brasileiros de *Y. pestis*, por RAPD (Leal, 1998), PCR-Ribotipagem (Sobreira, 2002) e RFLP-IS (Silva, 2004). Em quase todos os casos, pouca ou nenhuma diferença entre os isolados foi encontrada, mesmo entre cepas oriundas de diferentes hospedeiros, região geográfica ou ano. Por outro lado, estudos mais recentes utilizando MLVA (Oliveira *et al.*, 2012), PFGE (Barros, 2007) e CRISPR (em andamento), demonstraram, pela primeira vez, uma considerável diversidade genética entre os isolados brasileiros.

2.11.1. MLVA

O genoma de *Y. pestis* possui 63 locos de sequências repetidas em tandem denominadas VNTRs (*variable number tandem repeats*) classificadas em micro ou minissatélites (Le Flèche *et al.*, 2001). Aparentemente esses VNTRs não estão associados à função, entretanto a análise do número de repetições desses locos representa uma poderosa ferramenta para epidemiologia molecular, pois é possível identificar diversidade genética intraespecífica (Le Flèche *et al.*, 2001; de Benito *et al.*, 2004; Pourcel *et al.*, 2004) (Figura 22).

A análise das sequências VNTRs ou MLVA (*Multiple Locus VNTR Analysis*) é considerada um dos métodos mais estáveis, reprodutíveis e eficientes no estudo

epidemiológico de *Y. pestis*. Ao analisar um loco VNTR de diferentes cepas, por PCR ou sequenciamento, é possível detectar polimorfismos no número de cópias dos segmentos repetidos em tandem. Estas variações intraespecíficas podem resultar de eventos de inserção ou deleção, mostrando-se uma ferramenta útil para tipagem de patógenos como *Y. pestis* (Adair *et al.*, 2000; Klevytska *et al.*, 2001; Le Flèche *et al.*, 2001; Achtman *et al.*, 2004; Pourcel *et al.*, 2004; Lowell *et al.*, 2005).

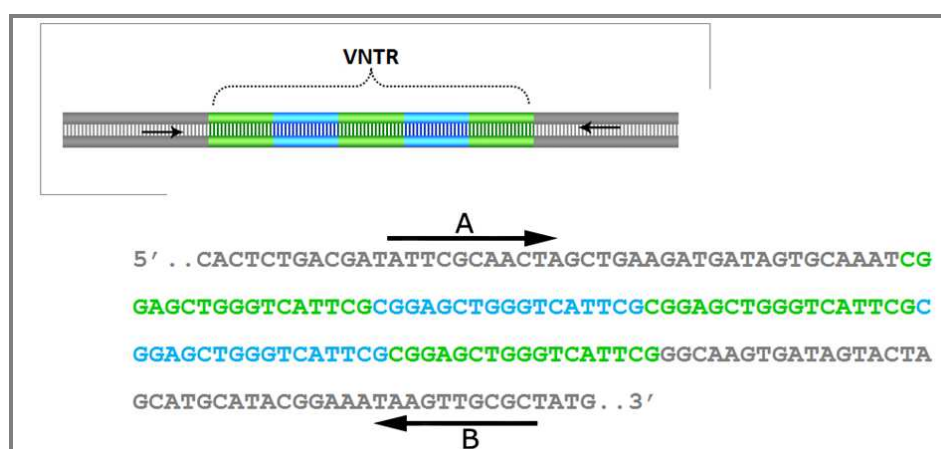


Figura 22: Esquema representativo de um loco VNTR de *Yersinia pestis* com cinco unidades repetitivas, constituídas por 17 pb. As setas indicam os sítios de ligação para os primers forward (A) e reverse (B).

2.11.2. PFGE

Eletroforeses convencionais em gel de agarose são capazes de separar fragmentos de DNA com tamanhos de 20 a 30 kb. Em 1984, Schwartz e Cantor desenvolveram uma técnica eletroforética capaz de separar e distinguir moléculas de DNA acima de 2 Mb, chamada Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). Esta técnica caracteriza-se pela identificação de padrões gerados após a digestão do DNA cromossômico por endonucleases de corte raro, seguida pela separação dos fragmentos por eletroforese com alternância direcional do campo elétrico, possibilitando a separação de fragmentos com elevado peso molecular (den Dunnen & van Ommen, 1993).

Apesar de ser uma técnica trabalhosa e cara, em termos de equipamentos e materiais de consumo, além de difícil interpretação, sendo necessária uma inspeção visual detalhada e análise subjetiva dos resultados, trata-se de uma ferramenta molecular altamente poderosa, capaz de detectar mínimos rearranjos cromossômicos (Tenover *et al.*, 1995). Sua sensibilidade e poder discriminatório dependem do organismo analisado e da enzima de restrição empregada, porém a alta relevância epidemiológica dos resultados tem feito desta técnica o “padrão ouro” para tipagem de muitas bactérias patogênicas, inclusive *Y. pestis* (Huang *et al.*, 2002).

O conhecimento da cadeia epidemiológica de qualquer enfermidade é passo fundamental para que sejam aplicadas medidas ideais de profilaxia e controle de uma doença. Ferramentas de tipagem molecular, utilizadas isoladamente ou em conjunto, oferecem subsídios robustos para epidemiologia moderna. Contudo, seus resultados precisam não somente ser discriminatórios, mas informativos o suficiente para que consigam estabelecer uma correlação apropriada entre grupos genéticos e a origem temporal e geográfica dos isolados. As propriedades ecológicas de transmissão/infecção de *Y. pestis* associado à características patogênicas, epidemiológicas e evolutivas podem ajudar a resolver questões sobre os ciclos epizooticos da peste, propagação na natureza e a estrutura epidemiológica que resulta na formação de focos.

3. Objetivos

3.1. Geral

Compreender a epidemiologia da peste e os mecanismos de virulência da bactéria, através da análise dos perfis genotípicos e os determinantes gênicos envolvidos na infecção/transmissão de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Nordeste do Brasil.

3.2. Específicos

- Identificar, entre duas técnicas de tipagem (MLVA e PFGE), aquela que ofereça melhor correlação temporal/geográfica entre 25 cepas de *Y. pestis* isoladas no Foco do Nordeste do Brasil;
- Determinar a(s) possível(eis) causa(s) da perda de virulência entre cepas de *Y. pestis* avirulentas isoladas no Brasil, analisando a presença e a atividade transcricional dos principais genes relacionados à patogenicidade/transmissão da peste;
- Verificar a integridade estrutural e funcional de genes da Ilha de Alta Patogenicidade de *Y. pestis*, para detecção de alterações entre isolados avirulentos e virulento de *Y. pestis*;
- Detectar a presença de proteínas exclusivas e diferencialmente expressas, através da análise proteômica de isolados avirulentos e virulento de *Y. pestis*.

4. Material e Métodos

4.1. Tipagem molecular

4.1.1. Cepas de *Y. pestis*

O estudo de tipagem envolveu 25 cepas de *Y. pestis*: 12 isolados de roedores e pulgas durante uma epizootia ocorrida no mesmo sítio e período (agosto de 1967) em Exu (Pernambuco) (Almeida *et al.*, 1985); 12 isolados de roedores durante um surto que envolveu vários sítios, no período de setembro a dezembro de 1986, no Estado da Paraíba (Almeida *et al.*, 1989); e uma cepa não relacionada aos eventos epidemiológicos anteriores, derivada da hemocultura do último caso humano de peste ocorrido no Ceará em 1997 (Leal-Balbino *et al.*, 2004) (Figura 23; Tabela 1).

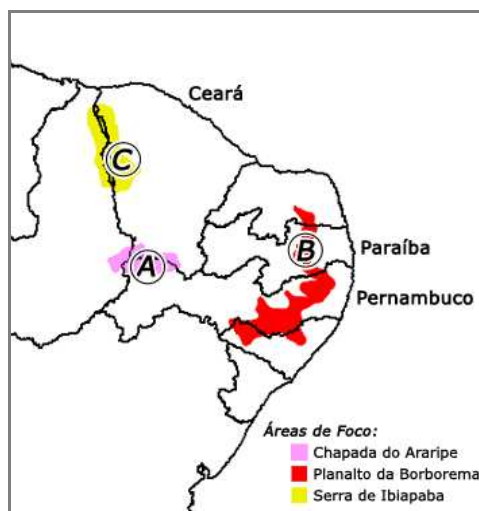


Figura 23: Localização dos municípios e respectivas áreas de foco onde foram isoladas as 25 cepas de *Yersinia pestis* analisadas na tipagem molecular. **A.** Exu (PE); **B.** Solânea (PB); **C.** Ipu (CE).

Tabela 1: Dados epidemiológicos das cepas de *Yersinia pestis* utilizadas no estudo de tipagem

Evento Epidemiológico	Ano	Estado	Área de Foco	Município	Origem Sítio	Cepa	Fonte*
Epizootia	1967	Pernambuco	Chapada do Araripe	Exu	Alagoinha	P.Exu 30	Pbj (NI)
						P.Exu 31	NI
						P.Exu 42	NI
						P.Exu 44	Pbj (NI)
						P.Exu 47	NI
						P.Exu 51	NI
						P.Exu 53	NI
						P.Exu 54	Rr
						P.Exu 57	NI
						P.Exu 59	Pbj (NI)
						P.Exu 61	NI
						P.Exu 67	NI
Surto	1986	Paraíba	Planalto da Borborema	Solânea	Pedra d'Água	P.PB 864	Rr
						P.PB 869	Hs
						P.PB 871	NI
						P.PB 879	Os
					Cinco Lagoas	P.PB 872	NI
						P.PB 876	Rr
						P.PB 877	Rr
					Bacalhau	P.PB 878	Os
						P.PB 880	Os
					Valério	P.PB 866	Rr
					Lagoa do Serrote	P.PB 867	NI
					Sete Lagoas	P.PB 873	Os
Isolado	1997	Ceará	Serra de Ibiapaba	Ipu	Ipuzinho	P.CE 882	H

* - H: humano; Hs: *Holochilus sciureus*; NI: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Pbj (NI): *Polygenis bolshi 42ordani* coletada de *N. lasiurus*.

4.1.2. MLVA

Para MLVA, foram selecionados 12 locos VNTRs descritos por Adair *et al.* (2000), Le Flèche *et al.* (2001) e Klevytska *et al.* (2001) (Tabela 2). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo 1 µL da suspensão de DNA extraído por fervura, 20 pmol de cada *primer*, 50 mmol KCl, 20 mmol Tris, 0.16 mmol dNTPs, 1.5 mmol MgCl₂ e 1 U de *Taq* DNA polimerase (*Promega*).

Para o loco *1AB*, a reação de amplificação consistiu de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. A reação de amplificação dos outros

locos consistiu de 35 ciclos de 94°C por 20 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 1 min. Os amplicons foram separados por eletroforese (100 V por 2-3 h) em gel de agarose 2.5% corado com SYBR Safe (Invitrogen). As imagens foram visualizadas em transiluminador de luz UV. Um marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder foi utilizado para cálculo do tamanho dos fragmentos pelo programa 1D Image Analysis v. 3.5 (Digital Kodak Science).

Tabela 2: Descrição dos locos VNTRs de *Yersinia pestis* analisados

Loco	Primers	Tamanho da Repetição*	Localização Genômica
ms04	(F) 5'-GCGATAACCCACATTATCACAATAACCAACAC-3' (R) 5'-GCTGATGGAACCGGTATGCTGAATTTGC-3'	17 pb	Cromossomo
ms05	(F) 5'-GCTTAGCCGCCAGAAAAGGTGAGTTGGC-3' (R) 5'-GATAATGGCGGTAGCCGGAATCTGATAATCATC-3'	17 pb	Cromossomo
ms06	(F) 5'-AATTTTGTCTCCCAAATAGCAT-3' (R) 5'-TTTTCCCATTAGCGAAATAAGTA-3'	60 pb	Cromossomo
ms07	(F) 5'-GCCACAGGAAGAGGACATTTTACAGAGAAAAC-3' (R) 5'-GTTGCTAAAACGATACCGCTACGATCAGC-3'	10 pb	Cromossomo
ms09	(F) 5'-CGTTACCTTGTGTTGCAATAGT-3' (R) 5'-ACGCAGAACATGCTTACCTTTTAT-3'	18 pb	Cromossomo
ms20	(F) 5'-GCAACCCGCTGAAGTTGTAAAAACCGAC-3' (R) 5'-GCGTTGATCTTCGCGGCCTTCAC-3'	15 pb	Cromossomo
ms30	(F) 5'-CAATAATACCATCGTGCGTGATAC-3' (R) 5'-TATTAATGGTGGTGTAGTCGCTGT-3'	54 pb	Cromossomo
ms45	(F) 5'-GCCGGTAGAGGCGTTGTCTTTGGTTTTTC-3' (R) 5'-GTTTTGGGGTTCAGTGCACGCTTGTGAC-3'	12 pb	Cromossomo
ms46	(F) 5'-CAGGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG-3' (R) 5'-CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA-3'	17 pb	Cromossomo
ms54	(F) 5'-GTCCACCATTTTCATACTGTCACTT-3' (R) 5'-GCTCTTTGTTGATTTTATTGAATG-3'	22 pb	Cromossomo
ms62	(F) 5'-GAATCGCGGGTTGACGCTGTTGAGC-3' (R) 5'-GCTGAACAGCCCCATAAAACCGGAGC-3'	9 pb	Cromossomo
1AB	(F) 5'-GGTTAGGTAGGGTGTGAAG-3' (R) 5'-AAAGAGGCTAAGTGGCAA-3'	4 pb	Cromossomo

* - Baseado nos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161, GenBank, NCBI).

(Fonte: Oliveira et al., 2012)

O número de unidades repetidas de cada loco foi estimado pela fórmula inferida por Adair et al. (2000):

$$\text{Nº de repetições} = \frac{\text{Tamanho do amplicon}^{\text{pb}} - \text{Tamanho das regiões flanqueadoras}^{\text{pb}}}{\text{Tamanho da repetição correspondente ao VNTR}^{\text{pb}}}$$

, onde o tamanho das regiões flangeadoras e da repetição de cada loco foram identificados através da análise *in silico* do genoma de *Y. pestis* CO92 no programa *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999).

A correlação de Pearson foi usada para analisar a similaridade entre as amostras. Para agrupamento e desenho do dendrograma, foi utilizado UPGMA pelo programa *BioNumerics* v. 6.0 (*Applied-Maths*). Os perfis de MLVA das 25 amostras foram normalizados pela utilização dos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161) e *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (GI:51594359) como padrões externos.

4.1.3. Análise discriminatória

O índice discriminatório dos locos VNTRs foi determinado pela fórmula descrita por Hunter e Gaston (1988):

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

, onde D = índice discriminatório, s = número total de alelos diferentes, n_j = número de isolados representando cada alelo e N = número total de isolados na amostra populacional. O valor D indica a probabilidade em que dois isolados, aleatoriamente selecionados dentro da população testada, apresentem diferentes alelos. De acordo com Hunter e Gaston (1988), um índice próximo ou superior a 0.90 pode ser interpretado como confiável.

4.1.4. PFGE

25 isolados foram submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), onde colônias crescidas em BAB (48 h) foram ressuspensas em tampão de suspensão celular (100 mM Tris; 100 mM EDTA, pH 8.0). A densidade ótica da suspensão foi mensurada em espectrofotômetro (610 nm) e ajustada para 1.0. Para confecção dos plugs, foram misturados rapidamente 200 µL da

suspensão bacteriana, 200 µL de agarose *BioRad* 2% (dissolvida em 10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA e SDS 1%) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL).

Para lise celular e purificação do DNA genômico, os plugs foram imersos em solução de lise (50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH 8.0; sarcosyl 1%; 500 µg de proteinase K), incubados por 2 horas a 54°C e lavados com água Milli-Q e TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0) pré-aquecidos a 50°C.

Apenas 1/3 (\cong 3 mm) de cada plug foi utilizado na reação de macrorrestrição do DNA cromossomal. Estes fragmentos foram estabilizados em 200 µL do tampão de restrição IV 1x (*New England Biolabs*) por 10 min a 37°C. O tampão de restrição foi substituído por 200 µL de tampão de restrição IV 1x e 20 U de *Ascl* (*New England Biolabs*). As amostras foram incubadas por 18 h a 37°C.

A reação foi interrompida pela substituição do tampão de restrição por 1 mL de TBE 0.5x (44.5 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0; 44.5 mM ácido bórico) à temperatura ambiente. Os plugs foram inseridos em gel de agarose 1% *Seakem Gold* dissolvida em TBE 0.5x. A eletroforese foi realizada com o sistema CHEF DR III (*BioRad*), sob voltagem de 4.5 V/cm a 14°C por 22 h, com pulsos iniciais de 1.8 seg e finais de 18.7 seg. O *Lambda Ladder PFG Marker* (*New England BioLabs*) foi utilizado como marcador de peso molecular. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1 mg/mL) e as imagens foram capturadas conforme descrito anteriormente (tópico 4.2.2.).

O grau de homologia entre as amostras tipadas pelo PFGE foi determinado pelo coeficiente de Dice (Dice, 1945). Para representação hierárquica da ligação entre os isolados, foi gerado um dendrograma, calculado por UPGMA, através do programa *BioNumerics* v. 6.0 (*Applied-Maths*), com otimização e tolerância de 1.5%, seguindo os padrões de agrupamento descritos por Tenover *et al.* (1995). Os pulsotipos das 25 amostras foram normalizados pela utilização da cepa vacinal de *Y. pestis* EV76 (Girard & Robic, 1936) como padrão externo. Paralelamente, essa amostra foi submetida a diferentes tempos de restrição (6-60 h), para atestar o corte único da enzima *Ascl* e reprodutibilidade do perfil de restrição.

4.2. Estudo de virulência

4.2.1. Bactérias e condições de cultivo

Para análise dos genes de virulência, foram utilizados dois subcultivos avirulentos, P.CE 882/1R e P.CE 882/32R, obtidos a partir do processo de repiques sucessivos *in vitro* por Leal-Balbino *et al.* (2004), derivados da hemocultura de um caso humano de peste ocorrido no Ceará em 1997. Além destes subcultivos, o estudo analisou outras duas cepas avirulentas, P.Exu 369 e P.Exu 390, ambas isoladas de *Necromys lasiurus* (roedor silvestre), no município de Exu (Pernambuco), em 1970. A cepa altamente virulenta 195P, utilizada como controle neste estudo, é derivada de um caso humano de peste pneumônica ocorrido na Índia em 1957 (Chen *et al.*, 1961). Todos os isolados pertencem ao biovar *Orientalis*.

Mantidas na coleção do Serviço de Referência em Peste do CPqAM (Fiocruz-CYP), as culturas foram reativadas em caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) e incubadas a 28°C por 48 h. Os isolados foram comparados a nível fenotípico (sensibilidade térmica, teste Pgm e DL₅₀ em camundongos), genotípico (perfil plasmidial, presença e sequenciamento de genes de virulência), transcricional (análise qualitativa e quantitativa da transcrição de genes de virulência) e proteômica (proteínas exclusivas e diferencialmente expressas).

4.2.2. Crescimento à 37°C

Para avaliar a sensibilidade térmica entre os isolados, a densidade ótica das culturas foi mensurada em espectrofotômetro (600 nm) e ajustada para 1.0. 50 µL de cada suspensão foi plaqueado em ágar sangue e incubados por 48 h, a fim de se avaliar o desenvolvimento das colônias a 37°C, mimetizando ao máximo as condições de crescimento *in vivo*.

4.2.3. Pigmentação em Agar Vermelho Congo

O teste Pgm permite diferenciar colônias potencialmente virulentas, coradas em vermelho (Pgm+) de colônias brancas (Pgm-), consideradas avirulentas, pois avalia a presença da HPI e a atividade do loco HMS (Fetherston *et al.*, 1992; Leal-Balbino *et al.*, 2004). Para isso, os isolados foram cultivados por 6 dias a 26°C em Agar Vermelho Congo. A cepa A1122 foi utilizada como controle Pgm-.

4.2.4. Avaliação do grau de virulência

Camundongos de laboratório (*Mus musculus*) são tradicionalmente usados no diagnóstico da peste e como modelo experimental. Contudo, trabalhos realizados no Brasil constataram que algumas linhagens poderiam ser resistentes a *Y. pestis* (dados não publicados). Dessa forma, fez-se necessário conhecer a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos para uso no diagnóstico e pesquisa. Os animais triados eram adultos, sem restrição quanto ao peso/sexo, com padrão sanitário SPF e pertencentes a três linhagens com padrão genético *inbred* (BALBc/An, CBA e C57BL/6) e uma linhagem *outbred* (Swiss Webster), fornecidas pelo biotério do CPqAM/Fiocruz e pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/Fiocruz).

Na triagem, a dose letal mediana (DL₅₀) foi calculada pelo método de Reed & Muench (1938), onde 04 suspensões bacterianas da cepa 195P (2 x 10⁰ a 2 x 10³ UFCs) foram individualmente inoculadas (200 µL) na região subcutânea inguinal, conforme descrito por Almeida *et al.* (1993) e o Manual de Utilização de Animais (CEUA, 2008). Após a inoculação, os animais foram acondicionados em mini-isoladores (Alesco) e observados por duas semanas até a morte espontânea ou submetidos à eutanásia. Foram realizadas coletas de sangue para diagnóstico sorológico e de espécimes (baço, fígado, pulmões), para diagnóstico bacteriológico e molecular pela equipe especializada do SRP (CPqAM/Fiocruz).

Após a identificação das linhagens sensíveis, uma delas foi selecionada para avaliação do grau de virulência das cepas brasileiras, através de diluições seriadas e inoculação para cálculo da DL₅₀, conforme descrito anteriormente. Toda

experimentação animal foi licenciada pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório do CPqAM (CEUA nº 02/2010).

4.2.5. Extração do DNA plasmidial

Para avaliar o conteúdo plasmidial, as cepas de *Y. pestis* foram cultivadas em BHI por 48 h e submetidas à lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). A cepa de *Escherichia coli* R861, cujo perfil plasmidial já se encontra descrito (Leal-Balbino *et al.*, 2004), foi utilizada como controle da extração. O produto da extração foi encaminhado para eletroforese em gel de agarose 0.6%, corado com brometo de etídeo e analisado em transiluminador de luz UV.

4.2.6. Extração do DNA genômico

Para os ensaios baseados em PCR, o DNA genômico foi extraído baseando-se no protocolo descrito por Keim *et al.* (2000) com algumas modificações. Cinco colônias de *Y. pestis* crescidas em BAB foram ressuspendidas em 200 µL de TE 10:1 (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA) e submetidas à fervura em banho-maria por 20 min. Após a fervura, o material foi centrifugado a 4°C por 2-3 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a -20°C para posteriores análises por PCR.

4.2.7. PCR-uniplex e PCR-multiplex

As culturas foram investigadas quanto à presença ou ausência dos principais genes de virulência (Tabela 3). As reações de PCR foram preparadas conforme descrito anteriormente (tópico 4.1.2.). As amplificações foram realizadas em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 2 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 40 seg a 60°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 10 min a 72°C, nas reações de PCR-uniplex e PCR-multiplex. Em todas as reações foi incluído um controle negativo, contendo apenas a mistura da reação sem adição de DNA molde.

Tabela 3: Genes de *Yersinia pestis* investigados por PCR

	Genes	Produto	Ação**	Primers	Tamanho esperado***	Referência dos primers
Plasmidiais	pPst	<i>pla</i> *	Proteína ativadora do plasminogênio	Disseminação a partir do sítio de inoculação e envolvida na forma pneumônica da doença.	(F) 5'-AAGTTCTATTGTGGCAACC-3' (R) 5'-GAAGCGATATTGCAGACC-3'	928 pb Leal & Almeida (1999)
	pYV	<i>lcrV</i> *	Antígeno V	Antifagocítica.	(F) 5'-AGAGCCTACGAACAAAACCCAC-3' (R) 5'-GCAGGTGGTGGCAAAGTGAGAT-3'	813 pb Leal & Almeida (1999)
	pFra	<i>caf1</i> *	Antígeno capsular F1	Antifagocítica.	(F) 5'-TTGGAACATTGCAACTGCTA-3' (R) 5'-TTAGATACGGTTACGGTTA-3'	469 pb Leal & Almeida (1999)
		<i>ymt</i>	Fosfolipase D (antiga toxina murina)	Envolvida na sobrevivência da bactéria no trato intestinal da pulga.	(F) 5'-TATATGCAACGGCAAGAGGAC-3' (R) 5'-TGACAGATAACCGGGATAAAGATT-3'	807 pb Leal-Balbino <i>et al.</i> (2004)
Cromossomais	Hms	<i>hmsH</i>	Enzima HmsH	Envolvida na formação de biofilme para bloqueio do proventrículo da pulga.	(F) 5'-TAAAGAAAGACCCACCAATC-3' (R) 5'-ATCATCGGCATCAAGCAAATC-3'	731 pb Leal-Balbino <i>et al.</i> (2006)
	HPI	<i>ybtE</i>	Salicil-AMP ligase	Envolvida na biossíntese do sideróforo yersiniabactina.	(F) 5'-CCCTTACCCATTGCCGAAC-3' (R) 5'-TCCCCACCTCATCCAGCC-3'	1189 pb Leal-Balbino <i>et al.</i> (2006)
		<i>psn</i>	Receptor Psn	Receptor do sideróforo yersiniabactina.	(F) 5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGTA 3' (R) 5'-CAACATCGTCACCCAGCA-3'	949 pb Leal-Balbino <i>et al.</i> (2006)
		<i>irp2</i> *	HMWP2	Peptídeo sintetase envolvido na biossíntese do sideróforo yersinia bactina.	(F) 5'-AAGGATTCGCTGTACCGGAC-3' (R) 5'-TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT-3'	287 pb Leal & Almeida (1999)
		<i>fur</i>	Proteína regulatória Fur	Repressor da HPI.	(F) 5'-GAAGTGTTGCAAAATCCTGCG-3' (R) 5'-AGTGACCGTATAAATACAGGC-3'	328 pb Leal-Balbino <i>et al.</i> (2006)
		YPO2271	Gene hipotético do profago filamentoso YpfΦ	Associado à virulência em camundongos, mas sem função esclarecida.	(F) 5'-TCAGGCAAAGTTGATGCG-3' (R) 5'-CATATGCTAGGGCTTCTCTAAG-3'	169 pb Presente estudo
		YPO2281	Gene hipotético do profago filamentoso YpfΦ	Associado à virulência em camundongos, mas sem função esclarecida.	(F) 5'-ATTCATGACACATCAGGAGCTG-3' (R) 5'-GGCCTGTTTCATCCAGTTAGTTG-3'	192 pb Presente estudo
		<i>phoP</i>	Proteína regulatória PhoP	Regula a multiplicação bacteriana no interior de macrófagos.	(F) 5'-CTTATCCGTCGCTGGCGTAG-3' (R) 5'-CTTCACCTGATGTTCTGCC-3'	442 pb Presente estudo
		<i>sodA</i>	Superóxido desmutase	Proteção contra ação oxidativa dos neutrófilos.	(F) 5'-TGCCATCACTGCCTTATGC-3' (R) 5'-CAGTTTGCCGTCGCTTTTC-3'	407 pb Presente estudo
		<i>psaA</i>	Antígeno pH 6.0	Antifagocítica e envolvida na forma pneumônica da doença.	(F) 5'-CATGAAAATGAAATGTTTTC-3' (R) 5'-AATACATACTCTCAACACGC-3'	474 pb Presente estudo

* - Amplificados juntos na reação de PCR-multiplex.

** - Prentice & Rahalison, 2007; Carniel, 2008.

*** - Baseado nos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161, *GenBank*, NCBI).

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1.5%, corados com *SYBR Safe* (*Invitrogen*). As imagens foram visualizadas e capturadas em transiluminador de luz UV pelo programa 1D *Image Analysis* v. 3.5 (*Digital Kodak Science*). Um marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR.

4.2.8. Sequenciamento de genes da HPI

Três genes da HPI (*ybtE*, *psn* e *irp2*), codificadores de proteínas altamente relacionadas à virulência de *Y. pestis*, foram submetidos ao sequenciamento a fim de se analisar sua integridade estrutural. Para isso, foi utilizada a técnica *Primer Walking*, na qual foram desenhados *primers* (Tabela 4) cujos produtos amplificados se sobrepõem, resultando no mapeamento completo da região.

Os programas Primer3-web v.0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) e AutoDimer v.1.0 (Vallone & Butler, 2004) foram utilizados, respectivamente, no desenho e avaliação do desempenho dos *primers*, tomando-se como base os dados genômicos da cepa de *Y. pestis* CO92 (NCBI, RefSeq NC_003143.1).

Foi estimado que as ORFs dos genes *ybtE* (1578 pb) e *psn* (2022 pb), juntamente com a região intergênica (130 pb) e suas regiões flangeadoras (± 80 pb), totalizariam aproximadamente 3.900 pb, sendo subdivididas em seis *contigs* (A-F) (Figura 24A). Já a ORF do gene *irp2* (6108 pb) e suas regiões flangeadoras (± 90 pb) totalizariam aproximadamente 6.300 pb, sendo subdividido em dez *contigs* (A-J) (Figura 24B).

Para a PCR, foram utilizados os parâmetros descritos no tópico 4.1.2. O material amplificado foi submetido à purificação pelo PureLink PCR Purification Kit (*Invitrogen*, Brasil), quantificação pelo NanoDrop 2000c (*Thermoscientific*) e encaminhados para sequenciamento pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/Fiocruz, em sequenciador ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*), utilizando o BigDye Kit (*Applied Biosystems*). O sequenciamento de cada segmento foi realizado em quadruplicata, com duas reações utilizando o *primer forward* e duas utilizando o *primer reverse*, descritos na Tabela 4. Para análise dos

eletroferogramas e formação da sequência consenso, foi utilizado o programa SeqMan II v.5.00 (*DNASar*). As sequências foram comparadas através de alinhamentos múltiplos gerados no programa MEGA v.4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007).

Tabela 4: Primers utilizados no sequenciamento dos genes *ybtE*, *psn* e *irp2* da HPI de *Yersinia pestis*

Alvo	Segmento	Primers	Tamanho esperado*	Referência dos primers
<i>ybtE</i> + <i>psn</i>	A	(F) 5'-GCAGATTGTCCGCCATTTTC-3' (R) 5'-GCGAGATACACGCTCTGTTG-3'	726 pb	Presente estudo
	B	(F) 5'-CCTACTGCGGGTCTTGATG-3' (R) 5'-TGCGACTCTGCTGAGTTACTG-3'	707 pb	Presente estudo
	C	(F) 5'-TAACTTCAGCGCTTCTGCTG-3' (R) 5'-CTTGCACTTCCGCTAAACG-3'	743 pb	Presente estudo
	D	(F) 5'-CCTGGGAAATGGGCTTTG-3' (R) 5'-CGGGTGCCAAGTTCATAG-3'	754 pb	Presente estudo
	E	(F) 5'-GGGACGCATAAAAGAGCAG-3' (R) 5'-GCGCTGACAACAGTAGACG-3'	637 pb	Presente estudo
	F	(F) 5'-TAATGCCAGACTTCACAGC-3' (R) 5'-ATCCCACATAGGCGTCCTG-3'	710 pb	Presente estudo
<i>irp2</i>	A	(F) 5'-ATAAACCCGTTTCGGGTAGC-3' (R) 5'-GTAAAAGACGGTGGCTCAGG-3'	749 pb	Presente estudo
	B	(F) 5'-TGGGCTTTGAGCAGGATAAC-3' (R) 5'-CCATAATCGGTCCCGTTTCCTAAG-3'	702 pb	Presente estudo
	C	(F) 5'-GCCATAACGACGCTGAAAG-3' (R) 5'-GTGGGGGTAGCGCTGCTG-3'	767 pb	Presente estudo
	D	(F) 5'-TCGATCTCCAGGTCGGATAC-3' (R) 5'-CCGGTTTGAGCAGATTACG-3'	747 pb	Presente estudo
	E	(F) 5'-CGTCGAATTACTCCGTGAAC-3' (R) 5'-AAGGACGGGAATATCGTCTG-3'	745 pb	Presente estudo
	F	(F) 5'-ATTGACTACCGGCGCTGAAG-3' (R) 5'-TATCCAGACACAGCCACAGG-3'	715 pb	Presente estudo
	G	(F) 5'-ACGGCGCGAGAAAATCTAC-3' (R) 5'-GAATTCGCAGGCGTTAGAC-3'	650 pb	Presente estudo
	H	(F) 5'-CTTGAGCAGAGCCAGGAGATG-3' (R) 5'-GATAAGAGTTGCTGCCAGAG-3'	641 pb	Presente estudo
	I	(F) 5'-GCCACGCCGAAAACCTG-3' (R) 5'-TGAAGGAAATCGGCTACCTG-3'	698 pb	Presente estudo
	J	(F) 5'-ATCATCGGAACCCGGCACTG-3' (R) 5'-GCATTCCAGAGGGACAGAC-3'	664 pb	Presente estudo

* - Baseado nos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161, *GenBank*, NCBI).

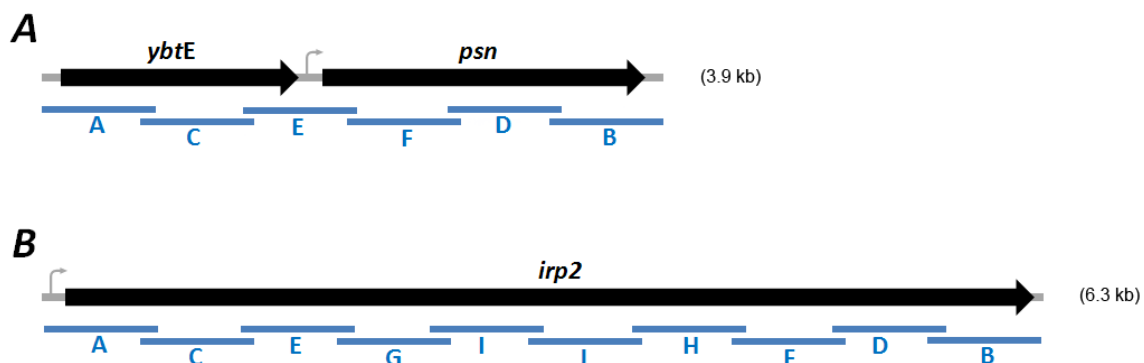


Figura 24: Esquema do sequenciamento *Primer Walking* para cobertura dos genes *ybtE* + *psn* (A) e *irp2* (B) da HPI de *Yersinia pestis*. As linhas cinza representam as regiões flanqueadoras e intergênicas. As setas pretas representam as ORFs. As setas cinza equivalem às regiões promotoras. Os segmentos em azul representam os *contigs* gerados após o sequenciamento.

4.2.9. Extração de RNA

Para análise de transcrição e síntese de cDNA, as amostras foram plaqueadas. O RNA total foi extraído segundo recomendações do fabricante do reagente Trizol (*Invitrogen*), a partir das culturas crescidas por 48 h a 37°C em ágar sangue. A integridade do RNA foi checada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1 mg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV. Sua quantificação e grau de pureza foram avaliados em NanoDrop 2000c (*Thermoscientific*).

4.2.10. RT-PCR

Para a transcrição reversa, 400 ng do RNA total foi tratado com 4 U de DNase I (*Invitrogen*) e então submetido à transcrição reversa, utilizando-se 200 ng de *Random Primers* (*Invitrogen*) e 400 U da transcriptase reversa *SuperScript III* (*Invitrogen*) de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA foi submetido à PCR e eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente (tópico 4.2.7.). Em todas as reações, foram utilizados controles negativos de cada amostra, contendo apenas a mistura da reação sem adição da transcriptase reversa. Este controle avalia a eficiência do tratamento

com a DNase I, atestando a ausência de DNA contaminante nas amostras de cDNA.

4.2.11. qRT-PCR

Para quantificação relativa da transcrição dos genes da HPI (*ybtE*, *psn* e *irp2*) foi utilizado o Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), seguindo todo procedimento de otimização dos *primers* e avaliação da eficiência da reação descritos no manual do produto. Como controle endógeno da reação, foi utilizado o gene *rpsL*, codificador da proteína ribossomal S12. Os *primers* utilizados neste experimento foram desenhados conforme descrito anteriormente (tópico 4.2.8.) e encontram-se descritos na Tabela 5.

Os experimentos foram realizados em triplicata experimental e duplicata biológica, em placas de 96 poços, com um volume final de 15 µL por poço. A reação de PCR em tempo-real foi realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/Fiocruz, em ABI 7500 (*Applied Biosystems*), cujo programa (7500 software v.2.0.4, *Applied Biosystems*) foi configurado para avaliação da curva de *melt* (detecção de amplificações inespecíficas) e análise de $\Delta\Delta CT$ (quantificação relativa), seguindo o modelo descrito por Pfaffl (2001). Os ensaios de quantificação relativa ($\Delta\Delta CT$), normalizados pelo gene *rpsL* e pela cepa controle 195P.

Tabela 5: *Primers* utilizados na qRT-PCR dos genes da HPI de *Yersinia pestis*

Gene	<i>Primers</i>	Tamanho esperado*	Referência dos <i>primers</i>
Controle Endógeno	<i>rpsL</i> (F) 5'-AAGCCACGCAGCATGAAG-3' (R) 5'-ACGCAGTGCGGAGTTAGG-3'	123 pb	Presente estudo
	<i>ybtE</i> (F) 5'-ACCTTTGACTGTACCCTGCAAC-3' (R) 5'-CATCCAGAGGGGACAACG-3'	124 pb	Presente estudo
HPI	<i>psn</i> (F) 5'-TGTTACGCCAGGTTGATGAC-3' (R) 5'-ATTTCCCAGGGCTGATCG-3'	127 pb	Presente estudo
	<i>irp2</i> (F) 5'-CTTGAGCAGAGCCAGGAGATG-3' (R) 5'-GATAATGTCCGCCAGTGAG-3'	123 pb	Presente estudo

* - Baseado nos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161, *GenBank*, NCBI).

4.2.12. SDS-PAGE do extrato proteico

Para avaliar se o perfil proteico divergia entre os isolados de *Y. pestis*, foi realizada extração de proteínas totais das culturas crescidas a 37°C por 48 h em placas de ágar sangue, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970).

Os extratos proteicos foram ressuspensos em tampão de amostra (glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5%; SDS 2.3%; Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8), fervidos por três minutos e aplicados em gel 12.5% poliacrilamida / 0.1% SDS. O marcador LMW (*BioRad*) foi utilizado como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* de acordo com Sambrook *et al.* (2001).

4.2.13. Eletroforese bidimensional do extrato proteico

Com a finalidade de avaliar o perfil de expressão proteica diferencial e/ou exclusivo, as cepas, cultivadas nas condições anteriores (tópico 4.2.12), foram submetidas ao processo de eletroforese bidimensional. Aproximadamente 1×10^7 células bacterianas foram lavadas duas vezes em PBS gelado (NaCl 137 mM; Fosfato 10 mM; KCl 2.7 mM; pH de 7.4) e ressuspensas em 500 μ L de tampão de lise (ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4%; Tris-base 40 mM) com 1X inibidor de protease (*Roche*). O material foi purificado com o 2-D Clean-Up kit (*GE Healthcare*) e quantificado pelo 2-D Quant kit (*GE Healthcare*), de acordo com os respectivos manuais. As amostras foram analisadas em triplicatas, para evitar erros de interpretação no padrão de dispersão dos *spots* proteicos.

Para primeira dimensão, 300 μ g do extrato proteico de cada amostra foram diluídos no tampão de reidratação (ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 2%; IPG buffer 0.5%; DTT 2.8 mg; azul de bromofenol 0.002%), para um volume final de 250 μ L. Essa suspensão foi utilizada na reidratação *strips* pH 3-10 NL (13 cm) a 20°C *overnight*. A focalização (migração das proteínas para seu ponto isoelétrico) foi realizada em Ettan IPGphor 3 (*GE Healthcare*), seguindo os parâmetros *default* do equipamento.

Em seguida, as *strips* foram tratadas para segunda dimensão, lavando-as por 15 min com solução de equilíbrio 1 (ureia 6 M; glicerol 29.3%; SDS 2%; Tris-HCl 75 mM, pH 8.8; azul de bromofenol 0.002%; DTT 10 mg/mL) e por mais 15 min com solução de equilíbrio 2 (ureia 6 M; glicerol 29.3%; SDS 2%; Tris-HCl 75 mM, pH 8.8; azul de bromofenol 0.002%; iodoacetamida 25 mg/mL). A separação das proteínas pelo peso molecular foi realizada em gel 12.5% poliacrilamida / 0.1% SDS no sistema de eletroforese Protean II xi Electrophoresis Cell (*BioRad*), utilizando o marcador de proteínas pré-corado (*New England BioLabs*). Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie* coloidal (Neuhoff *et al.*, 1988) e estocados em ácido acético 10% a 4°C.

Através da parceria estabelecida com o Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP/UFPE), coordenado pelo Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior, os géis puderam ser digitalizados em ImageScanner III (*GE Healthcare*) e analisados com o auxílio do programa Image Master 2D Platinum 7.0 (*GE Healthcare*).

5. Resultados

5.1. Tipagem molecular

Todos os isolados amplificaram um fragmento de DNA para cada loco VNTR. Entre os 12 VNTRs analisados, cinco foram monomórficos para os 25 isolados de *Y. pestis* brasileiros (Tabela 6, destacado em vermelho).

Dentre os sete locos identificados como polimórficos, o *ms07* apresentou o maior grau de polimorfismo, com sete alelos (3-6 e 8-10 repetições) que divergiram, inclusive, entre os dois eventos epidemiológicos (índice discriminatório 0.84). Todos os outros locos polimórficos apresentaram pelo menos um alelo em comum entre os isolados da epizootia e do surto, resultando em índices discriminatórios entre 0.37-0.76 (Tabela 6; Figura 25).

Tabela 6: Número de repetições dos 12 locos VNTRs de *Yersinia pestis* analisados

Grupo	Cepa	Loco VNTR											
		ms04	ms05	ms06	ms07	ms09	ms20	ms30	ms45	ms46	ms54	ms62	1AB
Epizootia	P.Exu 30	7	11	9	8	20	9	8	8	4	5	6	11
	P.Exu 31	7	11	9	9	20	8	8	6	4	5	6	11
	P.Exu 42	8	11	9	9	20	8	8	7	4	5	3	11
	P.Exu 44	8	11	9	10	20	10	8	8	4	5	5	11
	P.Exu 47	8	8	10	9	20	10	8	6	4	5	4	11
	P.Exu 51	8	10	9	8	20	9	8	8	4	5	6	11
	P.Exu 53	7	11	9	9	20	9	8	8	4	5	5	11
	P.Exu 54	7	11	9	9	20	9	8	8	4	5	6	11
	P.Exu 57	7	13	8	8	20	9	8	8	4	5	4	11
	P.Exu 59	7	11	9	9	20	9	8	7	4	5	5	11
	P.Exu 61	7	10	9	9	20	8	8	8	4	5	4	11
	P.Exu 67	6	11	9	8	20	9	8	7	4	5	6	11
Surto	P.PB 864	9	11	9	6	20	8	8	7	4	5	5	11
	P.PB 866	9	11	10	5	20	8	8	10	4	5	6	11
	P.PB 867	7	10	9	5	20	8	8	7	4	5	5	11
	P.PB 869	8	11	8	5	20	7	8	10	4	5	6	11
	P.PB 871	8	10	9	4	20	7	8	7	4	5	5	11
	P.PB 872	8	10	9	3	20	7	8	7	4	5	5	11
	P.PB 873	8	10	8	3	20	7	8	7	4	5	5	11
	P.PB 876	9	9	9	3	20	6	8	6	4	5	5	11
	P.PB 877	9	9	9	5	20	7	8	6	4	5	5	11
	P.PB 878	7	10	9	5	20	7	8	7	4	5	5	11
	P.PB 879	9	9	9	3	20	7	8	7	4	5	5	11
	P.PB 880	9	11	9	6	20	7	8	7	4	5	5	11
Isolado	P.CE 882	7	10	9	7	20	8	8	7	4	5	4	11
Referência*	CO92	8	11	9	9	33	9	11	7	7	7	7	10
	IP32953	3	6	16	5	38	11	14	4	7	5	17	0

* - Baseado nos dados genômicos de *Y. pestis* CO92 (GI:30407161) e *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (GI:51594359) (*GenBank*, NCBI).

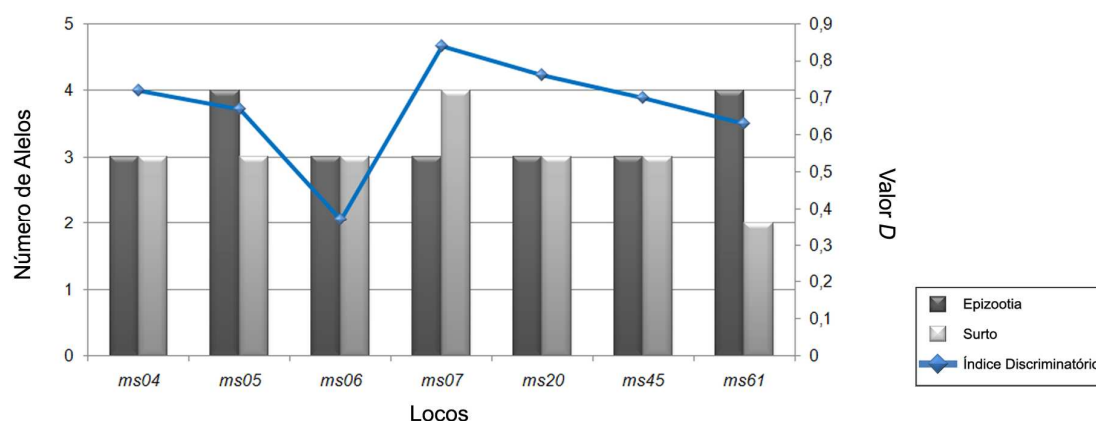


Figura 25: Número de alelos^(y) e índice discriminatório^(z) dos sete locos VNTRs polimórficos^(x) entre 24 isolados de *Yersinia pestis* associados à epizootia de 1967 (PE) e ao surto de 1986 (PB).

A combinação entre os diferentes alelos permitiram agrupar os 25 isolados e as duas cepas referência em quatro clusters distintos (A-D) no dendrograma, adotando um ponto de corte 95% de similaridade (Figura 26). O cluster A abrangeu as 12 cepas isoladas durante o surto na Paraíba. Considerando uma correlação de 97%, foi possível decompor este cluster em dois subgrupos, A¹ e A².

Onze isolados do cluster B (91.7%) foram subagrupados em B¹, tornando-os potencialmente responsáveis pela epizootia de 1967. Além das cepas relacionadas à epizootia ocorrida em 1967 no Estado de Pernambuco, o cluster B (Figura 26) envolveu uma cepa de *Y. pestis* isolada trinta anos depois no Ceará.

Os clusters C e D abrangeram as cepas utilizadas como grupo externo. O padrão externo *Y. pseudotuberculosis* IP32953 apresentou um perfil de MLVA próprio que, mesmo tratando-se de outra espécie, compartilhou $\cong 67\%$ de correlação com as amostras de *Y. pestis* pela análise de Pearson.

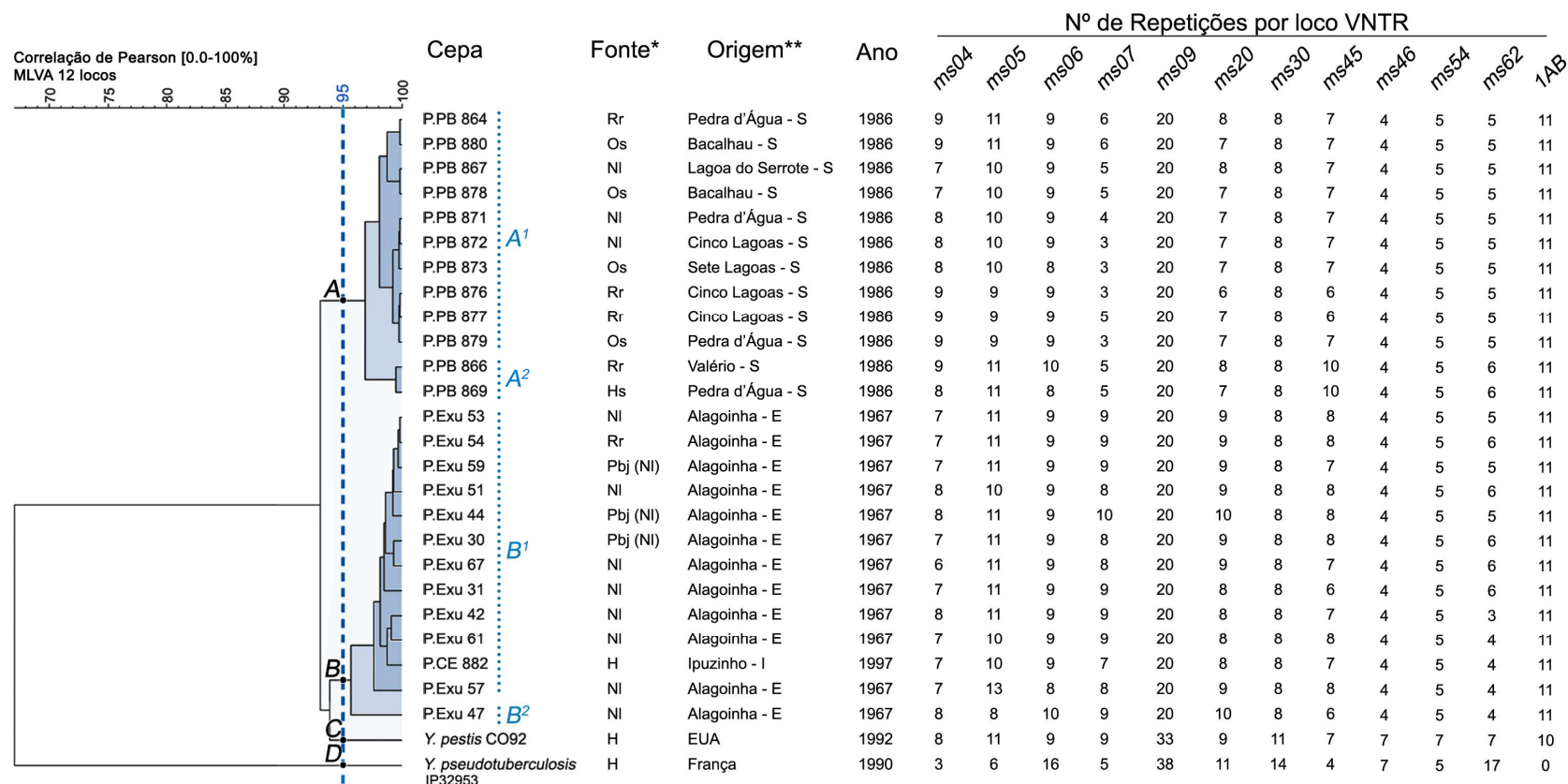


Figura 26: Dendrograma UPGMA gerado pela análise do polimorfismo de 12 locos VNTRs entre cepas *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*. * H: humano; Hs: *Holochilus sciureus*; Nl: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Pbj (Nl): *Polygenis bolshi jordani* coletada de *N. lasiurus*. ** S: Solânea, Paraíba; E: Exu, Pernambuco; I: Ipu, Ceará.

O padrão da macrorrestrição genômica obtido pela *Ascl*, gerou 18-26 fragmentos entre os isolados brasileiros. A estabilidade dos perfis de PFGE foi confirmada ao submeter uma mesma amostra (EV76) a diferentes períodos de restrição (6 a 60 h). Ao observar que o padrão de restrição manteve-se constante, pode-se atestar a especificidade da enzima *Ascl* utilizada no estudo (Figura 27).

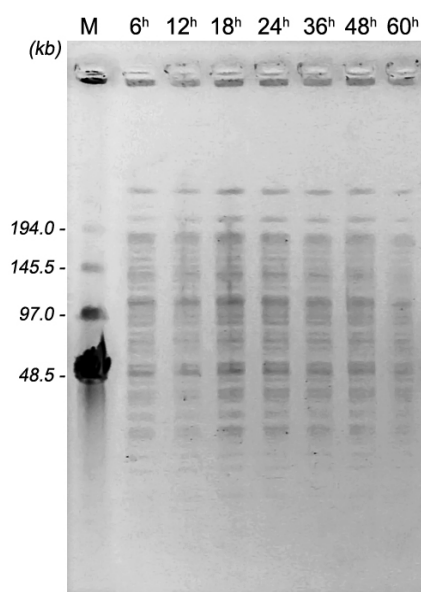


Figura 27: Gel representativo do teste de estabilidade frente a diferentes tempos de restrição pela enzima *Ascl* na técnica de PFGE. A cepa de *Yersinia pestis* utilizada no teste foi a EV76. **M:** Lambda Ladder PFG Marker (*New England BioLabs*).

Adotando-se um ponto de corte com 90% de similaridade, foram identificados sete clusters, A-F (Figura 28). A maioria das cepas de mesma origem espacial, temporal e de hospedeiro exibiu pulsotipos diferentes. Apesar dessa diversidade intraespecífica, de acordo com os critérios descritos por Tenover *et al.* (1995), o PFGE classificou os isolados brasileiros como intimamente relacionados (1-3 diferenças) e possivelmente relacionados (4-6 diferenças), sendo impossível traçar uma correlação epidemiológica ou temporal geográfica entre eles. Por outro lado, a cepa vacinal EV76, utilizada como padrão externo, foi devidamente agrupada como não-relacionada (≥ 7 diferenças) com as cepas brasileiras, apesar de compartilharem $\cong 77\%$ de similaridade.

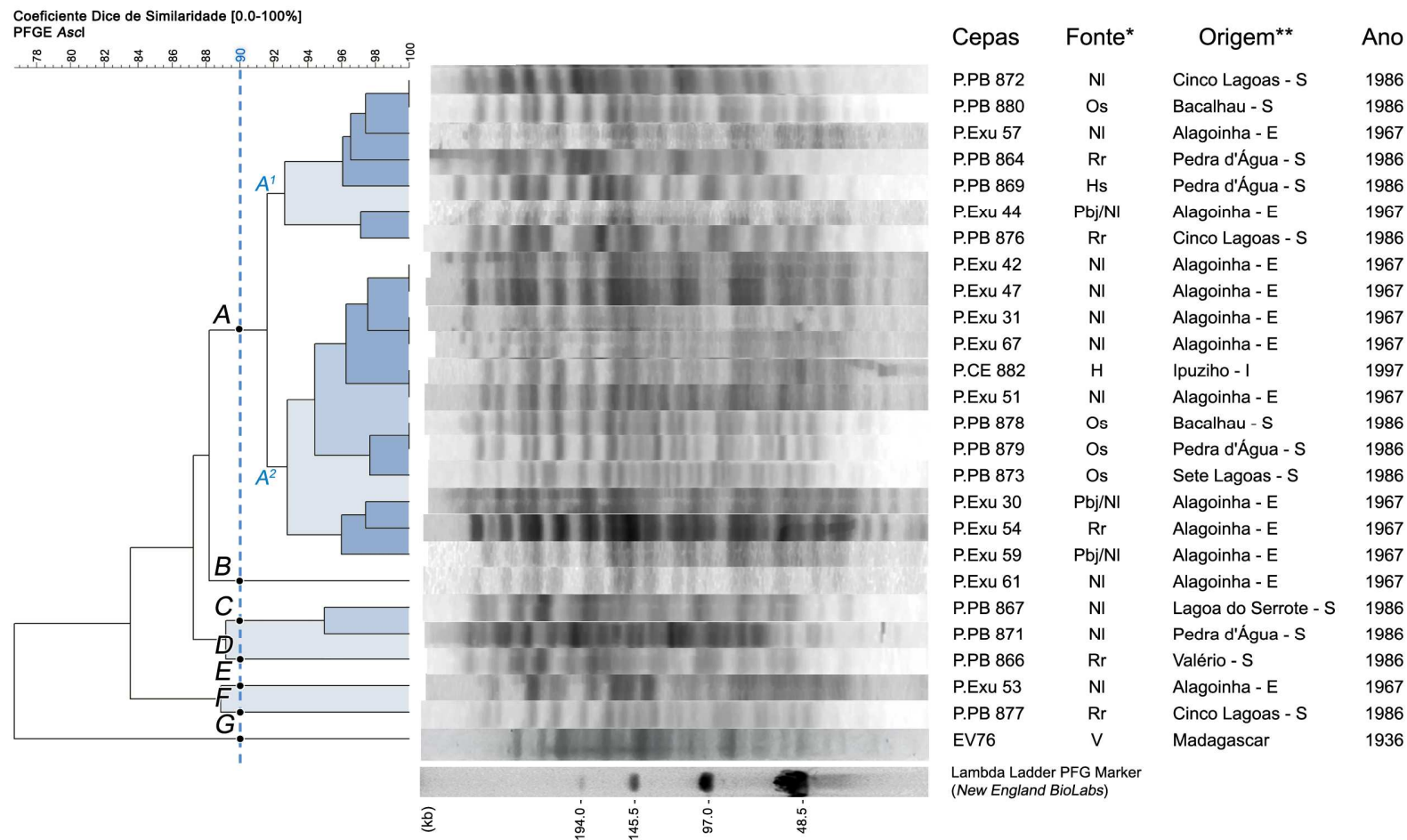


Figura 28: Dendrograma gerado pela análise UPGMA dos perfis de macrorrestrrição (PFGE Ascl) entre cepas brasileiras de *Yersinia pestis*. * H: humano; Hs: *Holochilus sciureus*; NI: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Pbj (NI): *Polygenis bolshi jordani* coletada de *N. lasiurus*; V: cepa vacinal (Girard & Robic, 1936). ** S: Solânea, Paraíba; E: Exu, Pernambuco; I: Ipu, Ceará.

5.2. Estudo de virulência

Nos testes fenotípicos desenvolvidos *in vitro*, tanto a cepa controle virulenta (195P) quanto os subcultivos avirulentos (P.Exu 369, P.Exu 390, P.CE 882/1R e P.CE 882/32R) mostraram-se capazes de crescer a 37°C em ágar sangue (Figura 29A). Além disso, os isolados demonstraram integridade do loco *pgm*, uma vez que foram classificados como Pgm+ (colônias vermelhas) no teste de pigmentação em Ágar Vermelho Congo (Figura 29B).

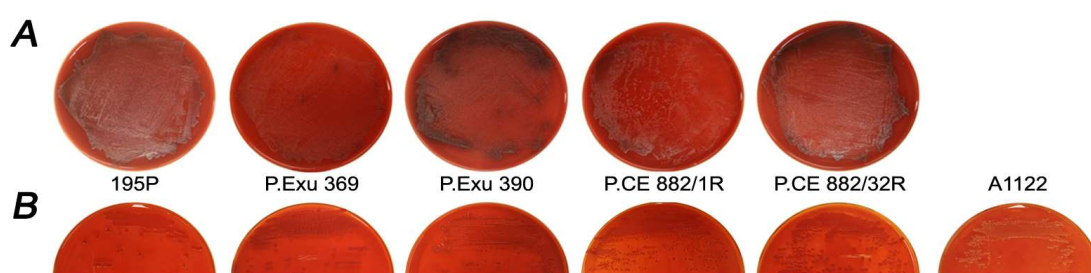


Figura 29: Resultados dos testes fenotípicos *in vitro* de *Yersinia pestis* para sensibilidade térmica e de pigmentação em Ágar Vermelho Congo. Todos os isolados apresentaram ótimo crescimento à 37°C (A) e foram classificados como Pgm+ (B). A cepa de *Y. pestis* A1122 foi utilizada como controle Pgm-.

Todas as linhagens de camundongos triadas (BALBc/An, CBA, C57BL/6 e Swiss Webster) mostraram-se sensíveis à peste, dessa forma, adotou-se, por convenção, a linhagem Swiss Webster para analisar o grau de virulência entre os isolados. Os valores encontrados no teste da DL_{50} em camundongos permitem classificar um isolado de *Y. pestis* em altamente virulento ($<1 \times 10^1$ UFCs), moderadamente virulento (1×10^3 a 1×10^4 UFCs) ou avirulento ($>1 \times 10^4$ UFCs) (Pollitzer, 1954; Prentice & Rahalison, 2007; Sun *et al.*, 2010). Dessa forma, foi possível determinar o grau de virulência das cepas em estudo, conforme descrito na Tabela 7.

Os animais inoculados com a cepa 195P apresentaram apatia e prostração nas primeiras 24 h, evoluindo para sepse e óbito em 3-5 dias, condizendo com uma doença de caráter hiperagudo. Já os animais inoculados com as cepas brasileiras, mesmo em altas dosagens, apresentaram uma leve apatia,

recuperando-se ao longo do terceiro ou quarto dia. Durante a necropsia desses últimos, foi observada apenas uma infecção local, com ou sem a formação de bubão inguinal e os testes sorológicos positivaram apenas nas dosagens mais elevadas de bacilos pestosos.

Tabela 7: Análise do grau de virulência de cepas de *Yersinia pestis* em camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss Webster

Cepa de <i>Yersinia pestis</i>	DL ₅₀	Grau de Virulência
195P	2×10^0 UFCs	Altamente virulenta
P.Exu 369	$> 4 \times 10^6$ UFCs	Avirulenta
P.Exu 390	$> 1.2 \times 10^8$ UFCs	Avirulenta
P.CE 882/1R	$> 2.4 \times 10^6$ UFCs	Avirulenta
P.CE 882/32R	$> 8 \times 10^6$ UFCs	Avirulenta

Os três plasmídios prototípicos (Figura 30A) e os 14 genes associados à virulência (Figura 30B) foram detectados nos quatro isolados avirulentos analisados.

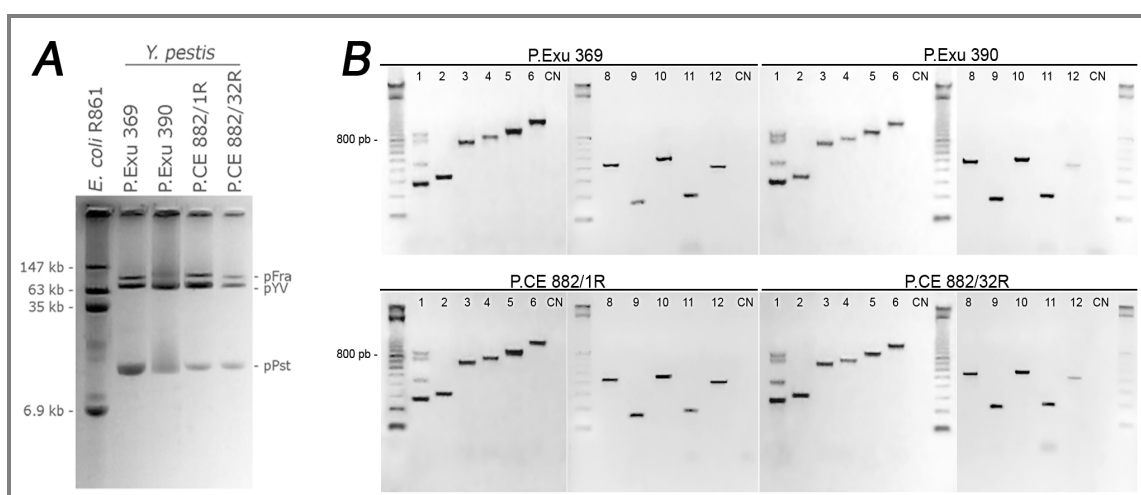


Figura 30: Géis representativos da extração plasmidial (A) e das PCRs direcionadas a 14 genes determinantes de virulência (B) de *Yersinia pestis*. 1: PCR-multiplex, onde em ordem crescente de peso molecular temos *irp2*, *caf1*, *lcrV* e *pla*. 2-12: PCR-uniplex, onde em ordem temos *fur*, *hmsH*, *ymt*, *psn*, *ybtE*, *phoP*, YOP2271, *psa*, YOP2281 e *sodA*. CN: controle negativo da PCR.

Após uma análise detalhada do eletroferograma e alinhamento múltiplo das sequências dos genes da HPI (*ybtE*, *psn* e *irp2*), não foi detectado nenhum polimorfismo entre os quatro isolados avirulentos, a cepa controle 195P e os dados genômicos da cepa CO92 (Figura 31). Até mesmo a região promotora do *psn* e do operon *irp2-irp1-ybtU-ybtE*, incluídas no sequenciamento, não apresentaram mutações pontuais, preservando os sítios de ligação para as proteínas regulatórias YbtA e Fur.



Figura 31: Eletroferograma (A) e alinhamento múltiplo (B) das sequências dos genes *ybtE*, *psn* e *irp2* da HPI de *Yersinia pestis*.

Todas as amostras de RNA total extraído mostraram-se íntegras e puras (Figura 32). Na análise de RT-PCR, foi possível detectar atividade transcricional entre os determinantes de virulência plasmidiais (*caf1*, *ymt*, *lcrV* e *pla*) e cromossomais (*fur*, *hmsH*, *phoP*, YOP2271, *psa*, YOP2281 e *sodA*) (Figura 33; Tabela 8). Já a análise transcricional dos genes da HPI (*irp2*, *ybtE* e *psn*) detectou níveis variáveis (baixa ou ausência) de transcrição entre os isolados avirulentos, até mesmo na cepa virulenta 195P, utilizada como controle (Figura 33, destacado em vermelho; Tabela 8).

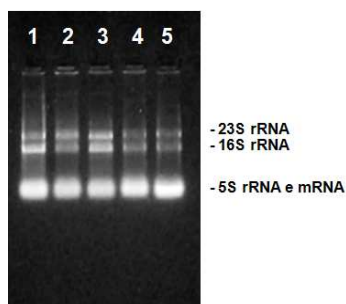


Figura 32: Gel representativo da extração de RNA total de *Yersinia pestis*. 1. 195P; 2. P.Exu 369; 3. P.Exu 390; 4. P.CE 882/1R; 5. P.CE 882/32R

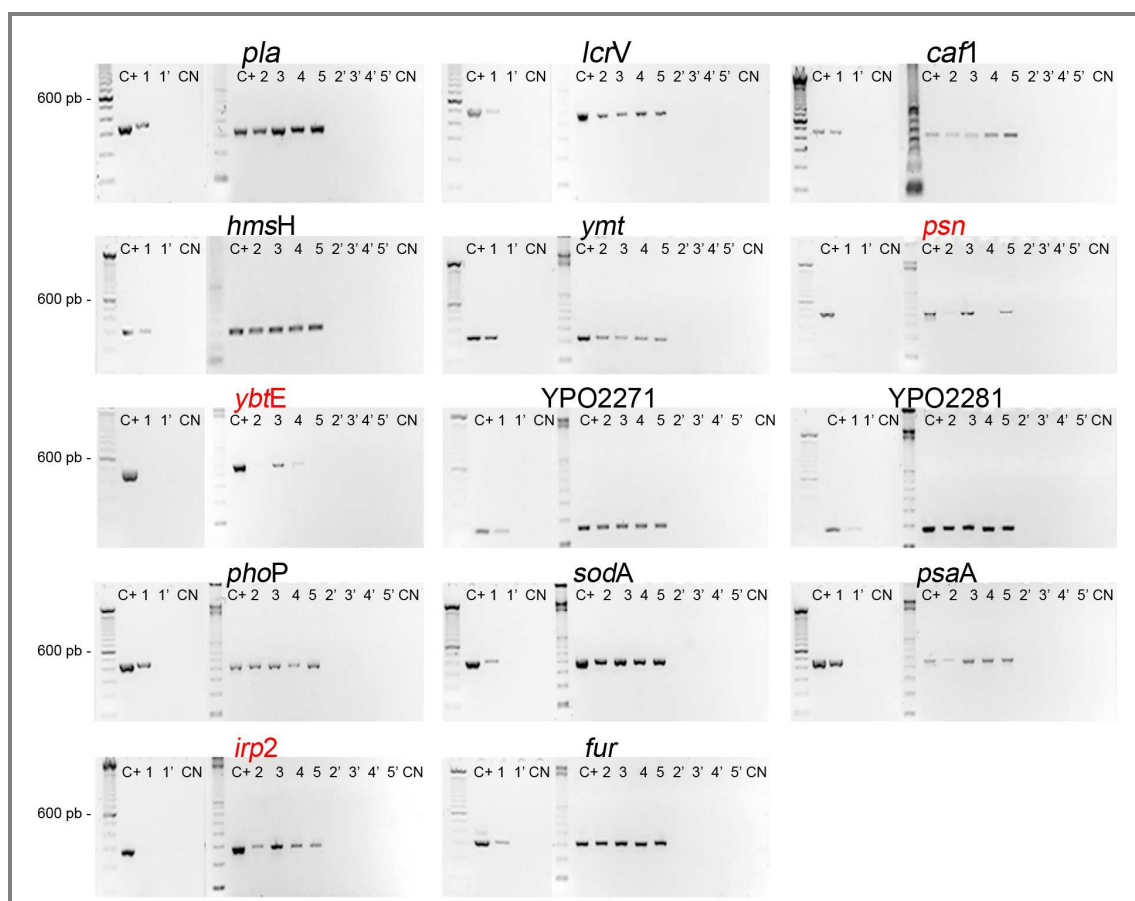


Figura 33: Géis representativos da análise transcricional de 14 determinantes de virulência de *Yersinia pestis*. C+: controle positivo da PCR (DNA). 1-5: RT-PCR das amostras 195P, P.Exu 369, P.Exu 390, P.CE 882/1R e P.CE 882/32R, respectivamente. 1'-5': controles negativos da RT, onde as amostras estão dispostas na mesma ordem. CN: controle negativo da PCR. Em destaque vermelho, encontram-se os genes da HPI, que mostraram níveis variáveis de transcrição.

Tabela 8: Resultados da análise de transcrição de 14 determinantes de virulência de *Yersinia pestis* por RT-PCR

Cepas	Genes												
	Plasmidiais				Cromossomais						Loco <i>pgm</i>		
	<i>pla</i>	<i>lcrV</i>	<i>caf1</i>	<i>ymt</i>	<i>fur</i>	YPO2271	YPO2281	<i>phoP</i>	<i>sodA</i>	<i>psaA</i>	HMS <i>hmsH</i>	HPI <i>ybtE</i>	HPI <i>psn</i> <i>irp2</i>
195P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P.Exu 369	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	- +/-
P.Exu 390	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P.CE 882/1R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	- +/-
P.CE 882/32R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+/- +/-

“+”: transcrição ativa; “-”: sem transcrição; “+/-”: baixa transcrição.

Os *primers* utilizados na análise de qRT-PCR dos genes da HPI foram otimizados para uma concentração final de 400 nM. Para curva padrão do teste de eficiência, foram utilizados cinco pontos de diluição 1:2 (0.625-10 ng) do DNA genômico purificado da cepa 195P, cuja eficiência da reação atingiu 87.1-100.5% (Figura 34A). A análise da curva de *melt*, constatou as temperaturas de desnaturação dos amplicons *rpsL*, *ybtE*, *psn* e *irp2* em 82°C, 84.5°C, 85.5°C e 88.5°C, respectivamente (Figura 34B). Esse resultado atesta a confiabilidade da análise quantitativa, pois não detectou nenhuma amplificação inespecífica.

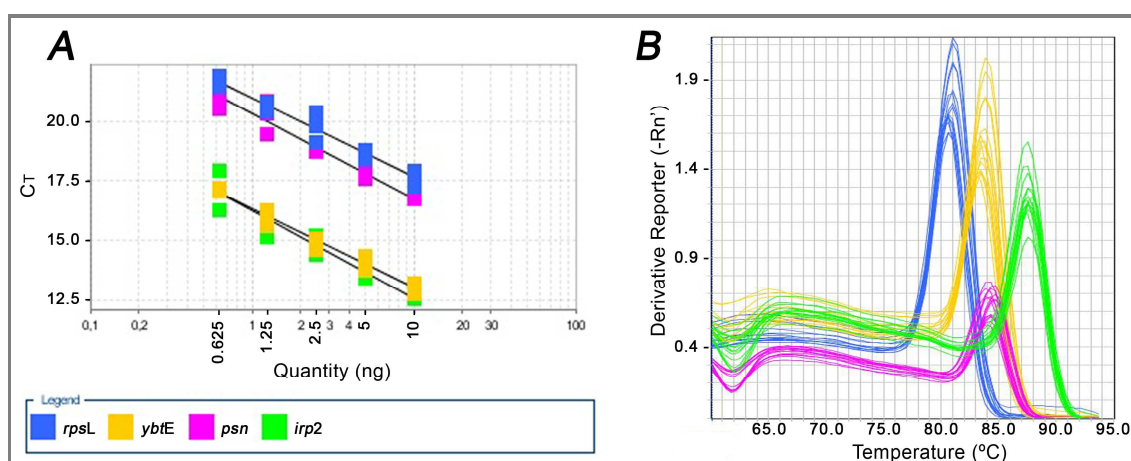


Figura 34: Curva padrão do teste de eficiência da qRT-PCR (A) e curva de *melt* (B) dos genes *ybtE*, *psn*, *irp2* e *rpsL* de *Yersinia pestis*.

Os ensaios de quantificação relativa revelaram baixos níveis de transcrição dos genes da HPI entre os isolados P.CE 882/1R e P.CE 882/32R, enquanto que os isolados P.Exu 369 e P.Exu 390 mostraram uma transcrição cerca de três vezes maior que a cepa controle virulenta (Figura 35).

Em SDS-PAGE, foram observadas diferenças na intensidade de várias bandas proteicas entre todas as amostras, direcionando o estudo para uma análise detalhada em eletroforese bidimensional (2D). Como estudo preliminar, apenas o perfil proteico da cepa P.CE 882/1R foi comparado com o perfil da cepa 195P, onde se pode identificar 575 *spots* proteicos para a cepa avirulenta e 617 *spots* no controle virulento, abrangendo 1.4-148.7 kDa. Dentre eles, foram identificados 498 *matches* (*spots* equivalentes) entre os dois isolados (Figura 36).

Para análise comparativa dos géis 2D, as imagens foram normalizadas com ajuste combinado de brilho/contraste e, para evitar desvios de interpretação, os *spots* das imagens triplicadas de cada amostra foram submetidos ao teste de ANOVA, considerando apenas um valor $p \leq 0.05$. Por fim, foram considerados apenas *spots* com proporção de expressão diferencial ≥ 1.5 vezes, limitando o estudo em 176 *spots* de interesse: 141 diferencialmente e 45 exclusivamente expressos (Figura 37).

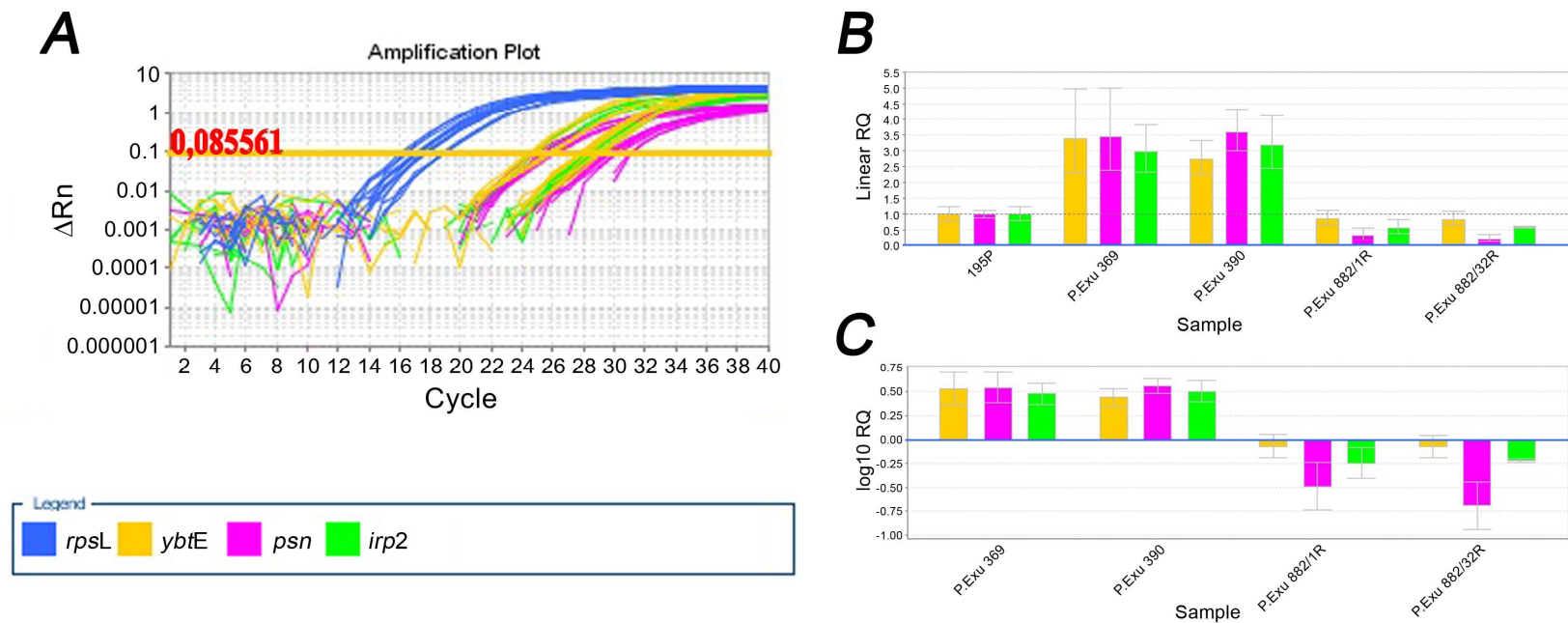


Figura 35: Gráficos da curva de amplificação (A), dispersão linear (B) e logarítmica (C) da quantificação relativa dos genes *ybtE*, *psn* e *irp2* de *Yersinia pestis*. A cepa 195P foi utilizada como referência e o gene *rpsL*, como controle endógeno.

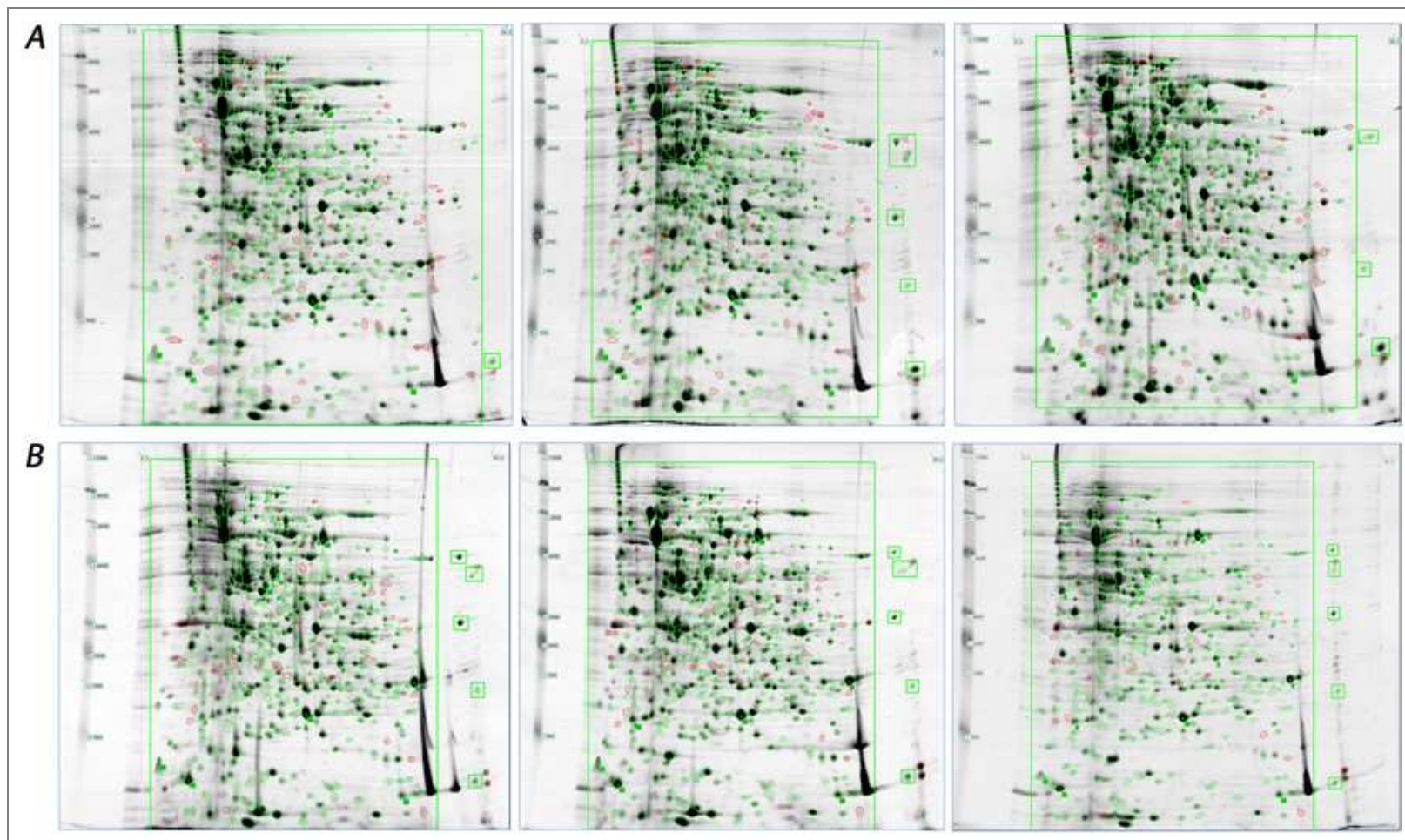


Figura 36: Géis representativos da eletroforese bidimensional (pH 3-10 NL) das triplicatas das amostras 195P (A) e P.CE882/1R (B) de *Yersinia pestis*. Os spots proteicos marcados em verde representam os spots equivalentes (*matches*), já os marcados em vermelho representam os spots exclusivos entre cada isolado.

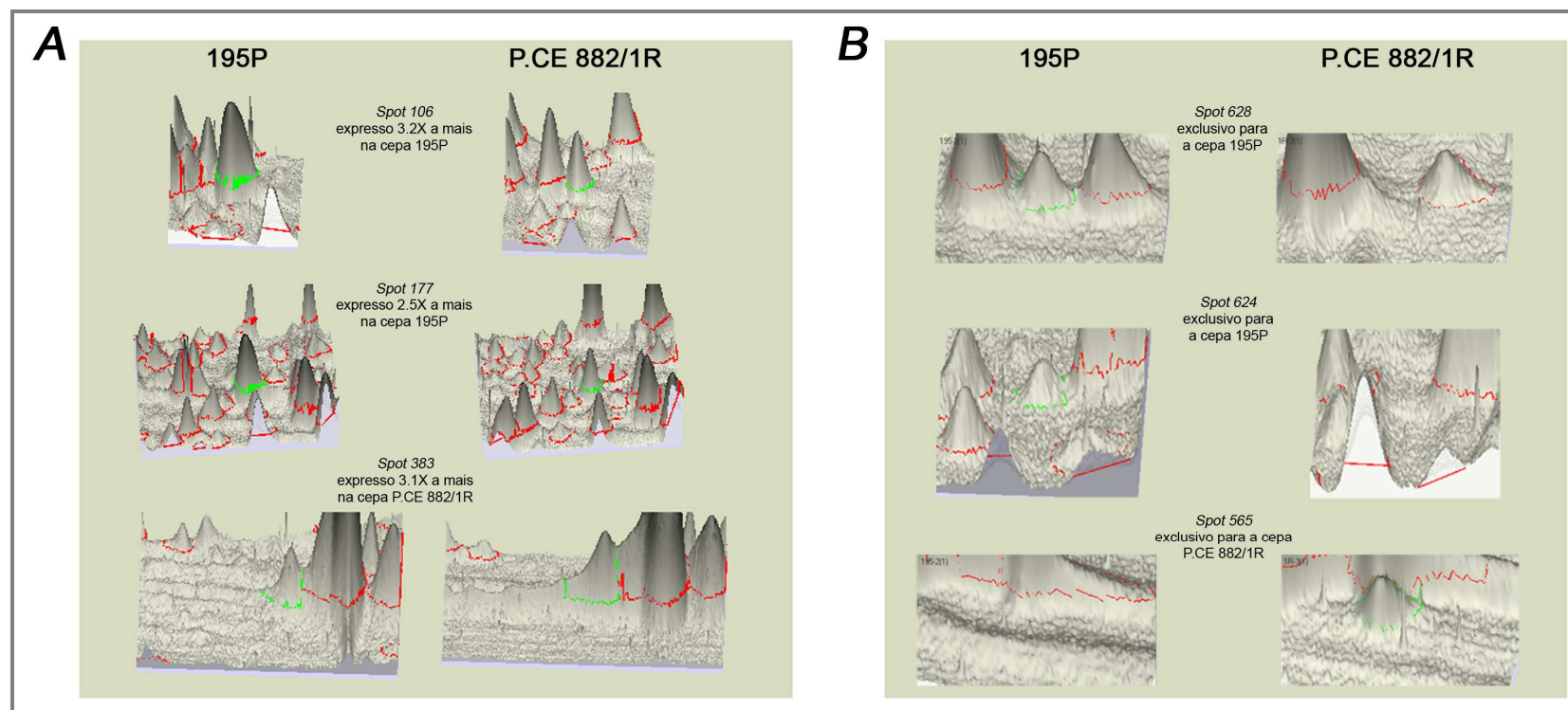


Figura 37: Representação tridimensional de *spots* (destacados em verde) diferencialmente (**A**) e exclusivamente (**B**) expressos em cepas de *Yersinia pestis*.

6. Discussão

6.1. Tipagem molecular

Com exceção do loco *ms30* analisado por Le Flèche *et al.* (2001), trabalhos anteriores identificaram polimorfismo para os locos VNTRs *ms04*, *ms05*, *ms06*, *ms07*, *ms09*, *ms20*, *ms45*, *ms46*, *ms54*, *ms62* e 1AB em cepas de *Y. pestis* oriundas de vários países/continentes (Adair *et al.*, 2000; Klevytska *et al.*, 2001; Le Flèche *et al.*, 2001; Pourcel *et al.*, 2004). O monomorfismo intrínseco encontrado nos locos *ms09*, *ms30*, *ms46*, *ms54* e 1AB, provavelmente, remete à ancestralidade comum dos isolados brasileiros.

Por abranger a maioria das cepas (83.3%), acredita-se que os isolados agrupados no clado A' do dendrograma gerado pelo MLVA (Figura 26) foram os responsáveis pelo surto de peste na região. Quando patógenos de múltiplos genótipos infectam um hospedeiro/vetor, eles competem entre si por nutrientes e na sua manutenção. Portanto, as cepas que possuem o maior número de determinantes de virulência ativo tendem a ser favorecidas. Esta variabilidade pode contribuir para a emergência e sazonalidade de perfis epidemiológicos distintos de *Y. pestis*.

Ao analisar os dados epidemiológicos, pode-se observar que a maioria dos isolados da epizootia de 1967 era derivada do roedor silvestre *Necromys lasiurus* e por suas pulgas (*Polygenys bohlsi Jordani*). De acordo com Baltazard (1968), *N. lasiurus* são os principais envolvidos na disseminação da peste no campo, devido a seu grande número populacional, extensão territorial, sensibilidade à peste e proximidade às residências. Contudo, espécies de roedores comensais e suas pulgas também podem adquirir a doença, desempenhando um importante papel na transmissão para o homem devido a sua proximidade com as residências.

Apesar do isolamento temporal e geográfico, a inclusão da cepa P.CE 882 no cluster B do dendrograma gerado pelo MLVA (Figura 26), pode estar relacionada à proximidade das áreas de foco (Chapada do Araripe e Serra de

Ibiapaba) (Figura 23). Isso justificaria o alto grau de correlação genética (97-99%) entre esses isolados, que provavelmente compartilharam um genótipo ancestral em comum durante o processo de interiorização da peste.

Segundo Vergnaud & Pourcel (2006), a homoplasia intínseca dos locos VNTRs (no contexto, quando dois alelos possuem o mesmo número de repetições apesar de possuírem históricos diferentes), é compensada pela análise de múltiplos marcadores. Sendo assim, a técnica de MLVA é capaz de distinguir cepas intimamente relacionadas e classificar relações distantes entre isolados de diferentes espécies bacterianas, desde que sejam avaliados múltiplos marcadores (Li *et al.*, 2009).

Leal *et al.* (2000), Cavalcanti *et al.* (2002) e Leal-Balbino *et al.* (2004, 2006) observaram alterações espontâneas no genoma (diferentes perfis plasmidiais e deleção do loco *pgm*) de *Y. pestis* isoladas no Brasil devido à estocagem prolongada e manipulação em laboratório. Entretanto, estudos conduzidos por Oliveira *et al.* (2012), envolvendo três culturas parentais e seus subcultivos obtidos por repiques sucessivos *in vitro*, não detectaram alterações nos locos VNTRs, confirmando a estabilidade deste marcador molecular para *Y. pestis*. A estabilidade da ferramenta MLVA para tipagem de *Y. pestis* também foi confirmada por outros grupos (Adair *et al.*, 2000; Keim *et al.*, 2000).

Dessa forma, o MLVA baseado em 12 VNTRs revelou que as populações de *Y. pestis* no Brasil não são monomórficas e demonstrou diversidade genética intraespecífica entre linhagens de peste no Brasil. Este trabalho possibilitou estabelecer pela primeira vez uma correlação entre os grupos genéticos com base na origem temporal e geográfica dos isolados brasileiros.

Segundo Najdenski *et al.* (1994), o genoma de *Y. pestis* é geralmente instável ao nível de macrorrestrição. A presença de vários elementos de inserção distribuídos no genoma de *Y. pestis* pode estar associada a esta variabilidade, pois resulta na plasticidade típica do genoma de *Y. pestis* (Parkhill *et al.*, 2001). Tenover *et al.* (1995) demonstraram que variações de duas a três bandas no perfil de macrorrestrição podem ser observadas em de coleção ou repicadas múltiplas

vezes, mesmo quando oriundas de uma mesma localidade. Entretanto, durante testes de reprodutibilidade do PFGE de *Y. pestis*, pudemos constatar o mesmo padrão de restrição entre os subcultivos das cepas P.Exu 340, P.Peru 375 e P.CE 882 (Figura 3 do Anexo 9.2). Sendo assim, o polimorfismo encontrado pela técnica de PFGE entre os 25 isolados, provavelmente reflete o processo de microevolução da bactéria devido à pressão ambiental enfrentada durante o processo de invasão e interiorização da peste no Brasil.

A classificação dos isolados brasileiros como intimamente relacionados e possivelmente relacionados, segundo os critérios de Tenover *et al.* (1995), ratificam a origem comum dos isolados brasileiros de *Y. pestis*, em conformidade com sua única introdução em 1899 (WHO, 1965; Baltazard, 2004). Sendo assim, a proximidade genética detectada no PFGE não permitiu correlacionar os isolados brasileiros com os dados históricos e geográficos dos dois eventos epidemiológicos estudados (Figura 28). Apesar de Huang *et al.* (2002) e Zhang *et al.* (2009) conseguirem estabelecer com sucesso uma correlação genotípica com grupos homogêneos de *Y. pestis* através do PFGE, Revazishvili *et al.* (2008) também encontraram dificuldade ao subtipar 40 cepas de focos endêmicos da República da Geórgia, sugerindo uma origem monoclonal desses isolados.

A utilização de mais de uma técnica molecular muitas vezes é necessária para aumentar a eficiência/poder da análise discriminatória entre os isolados. Contudo, tentativas de correlacionar técnicas de tipagem baseadas em PCR com o PFGE mostram-se muitas vezes infrutíferas (Kumari *et al.*, 1997; Silveira-Filho, 2007), pois tratam-se de grandezas genotípicas diferentes, sujeitas, portanto, a ajustes e adequação aos dados epidemiológicos.

6.2. Estudo de virulência

Segundo Carniel (2001), a frequência de excisão espontânea do loco *pgm* é muito alta (2×10^{-3}), provavelmente por recombinação homóloga entre as duas cópias de IS100 que flanqueiam o loco. Entretanto, mesmo após 32 repiques sucessivos *in vitro*, a amostra P.CE 882/32R preservou o loco *pgm*, como

observado por Leal-Balbino *et al.* (2006). Estes resultados dos testes fenotípicos *in vitro* são fortes indicativos da capacidade dos bacilos em desenvolver a peste, pois, além de resistir a mudanças de temperatura hospedeiro/vetor, a presença do loco *pgm* indica sua eficiência na utilização da pulga como vetor e aptidão para absorver ferro num hospedeiro mamífero (Bearden *et al.*, 1997).

Perry & Fetherston (1997), não identificaram alteração na DL₅₀ quando cepas de *Y. pestis* foram inoculadas pela via subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa em camundongos. Entretanto, detectaram um aumento de até 50X na DL₅₀ (redução na virulência), quando as cepas foram cultivadas a 25°C antes da inoculação, ao contrário da incubação a 37°C, indicando a relevância da regulação térmica de vários determinantes de virulência. No entanto, mesmo incubando os isolados brasileiros a 37°C antes da inoculação, não foi observada alteração no fenótipo de avirulência *in vivo*.

Apesar dos isolados brasileiros não desenvolverem o quadro clínico da peste, a presença dos plasmídios prototípicos e dos 14 genes determinantes de virulência analisados evidenciam que não houve cura plasmidial e confirmam a integridade do loco *pgm*. Assim, é possível inferir que outros fatores (mutações pontuais, rearranjos cromossômicos, alterações no mecanismo de regulação ou mesmo outros genes) possam estar envolvidos no processo de avirulência.

Experimentos realizados por Sebbane *et al.* (2010) indicaram que a inativação de qualquer enzima envolvida na síntese do sideróforo yersiniabactina pode resultar na avirulência em modelos animais. Dessa forma, genes da HPI (*ybtE*, *psn* e *irp2*) foram sequenciados, na tentativa de identificar mutações pontuais ou alterações estruturais que justificassem o fenótipo de avirulência encontrado nos quatro isolados brasileiros. Contudo, como não foi observada alterações no sequenciamento, resolveu-se investigar a habilidade transcricional dos principais genes de virulência através da RT-PCR.

A atividade transcricional dos genes *ymt*, *pla* e *hmsH* indica que os isolados P.Exu e P.CE, apesar de avirulentos, são capazes de colonizar o proventrículo da pulga e serem transmitidos pela picada desse vetor. Entretanto, esta capacidade

só poderá ser confirmada através de experimentos de transmissão, que encontram-se em andamento.

As variações nos níveis de transcrição dos genes da HPI, detectada na RT-PCR, sugerem que o ferro livre, presente no meio de cultivo *in vitro*, possa ter se associado à proteína regulatória Fur, impedindo/reduzindo a transcrição dos genes da HPI. Além disso, por se tratar de um teste qualitativo, a intensidade das bandas amplificadas a partir do cDNA não representa diferenças reais nos níveis de transcrição. Dessa forma, esses genes foram submetidos a uma análise transcricional quantitativa por meio de PCR em tempo real.

Nos ensaios de quantificação relativa, a atividade transcricional baixa dos genes da HPI entre os isolados P.CE 882/1R e P.CE 882/32R era esperada devido à presença de ferro livre no meio de cultura, conforme sugerido anteriormente. Surpreendentemente, mesmo com a oferta de ferro livre no meio, foi possível constatar que os isolados P.Exu 369 e P.Exu 390 expressaram os genes da HPI cerca de três vezes mais que a cepa referência. Como não foi detectada mutações nos genes *ybtE*, *psn* e *irp2* das cepas P.Exu 369 e P.Exu 390, pressupõe-se que haja uma disfunção no mecanismo regulatório da HPI.

Essa disfunção na regulação da absorção do ferro pode ser responsável pelo fenótipo de avirulência entre esses isolados, uma vez que, como mostrado em trabalhos anteriores (Staggs *et al.*, 1994), a superexpressão da HPI e consequentemente do sideróforo yersiniabactina pode resultar na intoxicação da bactéria pelo acúmulo do íon metálico na célula bacteriana. Esse evento culminaria na seleção de indivíduos mutantes para o loco *pgm* (Pgm-), que não são capazes de desenvolver a doença em roedores (Perry & Fetherston, 1997).

Por outro lado, Yoon *et al.* (2003) alertam para possíveis discrepâncias entre os dados proteômicos e transcricionais, pois diferentes níveis de transcrição de um gene nem sempre refletem na oscilação dos níveis proteicos, ou vice-versa. Tais inconexões são decorrentes da estabilidade/instabilidade do RNA ou da proteína, ou mesmo alterações dos mecanismos que regulam/estabilizam tais moléculas.

Enquanto a proteína Fur é uma reguladora global importante da HPI, Staggs *et al.* (1994) e Straley & Perry (1995) sugerem que outros reguladores hipotéticos sensíveis ao ferro provavelmente estão presentes em *Y. pestis*. Pelo menos nove proteínas auxiliares ferro-reprimida (Arps) e duas ferro-induzidas (Aips) parecem regular a captura do ferro em *Y. pestis*, de maneira independente do Fur. Essa poderia ser uma via alternativa adotada pelas cepas P.Exu 369 e P.Exu 390, pois mesmo após sucessivos cultivos *in vitro*, elas não foram selecionadas para o fenótipo Pgm- nos testes de pigmentação em Ágar Vermelho Congo (dados não mostrados), como sugerido por Perry & Fetherston (1997).

Como os resultados da análise transcricional foi inconclusiva, resolveu-se adotar uma abordagem mais abrangente, para investigação do motivo da avirulência das cepas, através da comparação do perfil proteico total entre os isolados. Segundo Rocha *et al.* (2005), a análise proteômica por meio da eletroforese bidimensional é capaz de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa, possibilitando análises de expressão gênica por meio da comparação de padrões proteicos, resultando numa avaliação qualitativa e quantitativa.

Chromy *et al.* (2005) realizaram uma caracterização proteômica de *Y. pestis*, identificando as proteínas expressas constitutivamente e aquelas expressas exclusivamente sob diferentes condições de temperatura e concentração de Cálcio. No nosso estudo, é provável que a maioria das proteínas com expressão invariável possa ser considerada *housekeeping*, pois não proporcionaram o fenótipo de virulência na cepa P.CE 882/1R. Por outro lado, oscilações no nível de expressão dessas proteínas podem levar ao fenótipo de avirulência, pois, segundo Perry & Fetherston (1997) e Motin *et al.* (2003), as necessidades nutricionais a 37°C são mais complexas e dependem do perfil plasmidial, da presença ou ausência de Ca^{++} , Na^+ e aminoácidos dicarboxílicos, e da integridade dos mecanismos relatórios.

As proteínas com expressão maior/exclusiva na cepa avirulenta podem ser um mecanismo de resposta ao estresse metabólico, que através da ativação de

vias alternativas, visam manter a integridade da célula. Como a cepa P.CE 882/1R perdeu sua virulência após um único subcultivo (Leal-Balbino *et al.*, 2004) e considerando a homogeneidade natural da espécie, era esperada a identificação de poucas alterações no seu perfil proteico. Dessa forma, acredita-se que outras mutações foram acumuladas ao longo do período de estocagem na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste, tornando sua caracterização proteômica complexa.

A identificação de *spots* exclusivos na cepa virulenta remete, portanto, às proteínas envolvidas não só no metabolismo basal de *Y. pestis*, como também na regulação gênica e na virulência da bactéria, conferindo o caráter altamente virulento à cepa 195P. A análise proteômica dos outros isolados avirulentos e a identificação precisa dessas proteínas divergentes por espectrometria de massas ajudarão a compreender os mecanismos metabólicos de *Y. pestis* que possam interferir na virulência do bacilo, assim como apontar para alvos de interesse para o desenvolvimento de vacinas e quimioterápicos.

Segundo Amedei *et al.* (2011), a interação patógeno-hospedeiro é um tema importante para a compreensão da patogênese e, conseqüentemente, o desenvolvimento de contramedidas de sucesso no controle da peste. Dessa forma, compreender a interação multifacetada entre *Y. pestis* e o sistema imune do hospedeiro permitirá projetar vacinas mais eficazes, que desenvolvam uma resposta imune humoral e celular efetiva contra a peste.

7. Conclusões

- Comparativamente, os resultados obtidos com MLVA mostraram maior poder discriminatório para tipagem de isolados brasileiros de *Y. pestis* em relação ao PFGE, possibilitando agrupar as cepas de acordo com os dados temporais/geográficos.
- A diversidade genética encontrada em cepas brasileiras de *Y. pestis* com as técnicas de PFGE, não foi informativa ao ponto de caracterizá-las como clones diferentes, ratificando a teoria de uma única entrada da peste no país.
- Além da correlação epidemiológica, o polimorfismo detectado com MLVA remeteu ao processo de interiorização da peste no Brasil, contudo a análise de um número maior de cepas permitirá esclarecer essa correlação histórica.
- O loco VNTR *ms07* mostrou-se promissor para tipagem de *Y. pestis*, devido ao seu alto grau de polimorfismo.
- De acordo com o perfil plasmidial e as análises de RT-PCR, a redução na virulência das cepas de *Y. pestis* P.Exu 369, P.Exu 390, P.CE 882/1R e P.CE 882/32R aparentemente não está associada à cura dos plasmídios prototípicos ou bloqueio transcricional dos 11 principais determinantes de virulência.
- A identificação de uma disfunção no mecanismo de regulação transcricional dos genes da HPI, detectada por qRT-PCR, não foi suficiente para determinar a causa de avirulência entre os isolados de *Y. pestis* P.Exu 369 e P.Exu 390.
- A análise proteômica parcial do subcultivo P.CE 882/1R, pela técnica de eletroforese bidimensional, indica que além de alterações nos mecanismos de virulência oriundas de um único repique, mutações nos genes envolvidos no processo metabólico e/ou regulatório da bactéria tenham sido acumulados, devido ao período de estocagem na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste.

8. Referências

- 1 ACHTMAN *et al.* Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. **PNAS**, v. 101, p. 17837-17842, 2004.
- 2 ACHTMAN *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **PNAS**, v. 96, p. 14043-14048, 1999.
- 3 ADAIR *et al.* Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1516-1519, 2000.
- 4 ALMEIDA *et al.* Contribuição para o diagnóstico de peste. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 53-55, 2007.
- 5 ALMEIDA *et al.* Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 249-256, 1989.
- 6 ALMEIDA *et al.* Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos de peste no Nordeste do Brasil de 1966 a 1982. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 207-218, 1985.
- 7 ALMEIDA *et al.* Transmission of *Yersinia pestis* cultures with different plasmid content from *Xenopsylla cheopis* to *Calomys callosus*. **Parasitology Research**, v. 89, p. 159-162, 2003.
- 8 ALMEIDA, A.M.P.; TAVARES, C.; LEAL-BALBINO, T.C. Peste. In: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 126, p. 1509-1522.
- 9 AMEDEI *et al.* Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, p. 628-639, 2011.
- 10 ANISIMOV, A.P.; LINDLER, L.E.; PIER, G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 434-464, 2004.
- 11 ARAGÃO *et al.* Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1990-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 143-148, 2002.
- 12 BALTAZARD, M. 4e rapport (mai 1970) Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 97, p. 93-117, 2004.

- 13 BALTAZARD, M. Pesquisas sobre a peste no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais**, v. 20, p. 371-390, 1968.
- 14 BARROS, M.P.S. Padronização e avaliação da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para tipagem molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no nordeste brasileiro. Resumo de tese de mestrado - CPqAM/Fiocruz. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 220, 2007.
- 15 BEARDEN, S.W.; FETHERSTON, J.D.; PERRY, R.D. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 5, p. 1659-1668, 1997.
- 16 BEN-EFRAIM, S.; ARONSON, M.; BICHOWSKY-SLOMNICKI, L. New antigenic component of *Pasteurella pestis* formed under specific conditions of pH and temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 81, p. 704-714, 1961.
- 17 BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 5, p. 573-580, 1999.
- 18 BERTHERAT, E. Comunicação pessoal durante o 10º International Symposium on *Yersinia*, Brasil, 2010.
- 19 BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 1513-1523, 1979.
- 20 BONVICINO, C.R.; Oliveira, O.S.; D'Andrea, O.S. **Guia dos roedores do Brasil**: com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2008. 120 p.
- 21 BRUNETEAU, M.; MINKA, S. Lipopolysaccharides of bacterial pathogens from the genus *Yersinia*: a mini-review. **Biochimie**, v. 85, p. 145-152, 2003.
- 22 BUBECK, S.S.; DUBE, P.H. *Yersinia pestis* CO92 *ypoH* is a potent live, attenuated plague vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 1235-1238, 2007.
- 23 BUCHRIESER, C.; PRENTICE, M.; CARNIEL, E. The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. **Journal of Bacteriology**, v. 9, p. 2321-2329, 1998.

- 24 BURROUGHS, A.L. Sylvatic plague studies: the vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. **Journal of Hygiene**, v. 43, p. 371-396, 1947.
- 25 BUTLER, T. Plague into the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 736-742, 2009.
- 26 CARNIEL, E. Pathogenic *Yersinia*: stepwise gain of virulence due to sequential acquisition of mobile genetic elements. In: HENSEL, M.; SCHMIDT, H. **Horizontal gene transfer in the evolution of pathogenesis**. Cambridge: University Press, 2008. cap. 8, p. 193-216.
- 27 CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. **Internal Microbiology**, v. 2, p. 161-167, 1999.
- 28 CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 561-569, 2001.
- 29 CAVALCANTI, Y.V.N.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Typing of *Yersinia pestis* isolates from the state of Ceará, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 1-6, 2002.
- 30 CDC. **Map: world distribution of plague, 1998**. Center for Disease Control and Prevention, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/world98.htm>>
- 31 CDC. **Questions and answers about plague**. Center for Disease Control and Prevention, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/qa.htm>>
- 32 CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais. **Manual de utilização de animais**. 1.ed. Fiocruz: Rio de Janeiro, 2008.
- 33 CHAIN *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4453-4463, 2006.
- 34 CHAIN *et al.* Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. **PNAS**, v. 101, p. 13826-13831, 2004.

- 35 CHEN, T.H.; ELBERG, S.S. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* Type I. **Infection and Immunity**, v. 15; p. 972-977, 1977.
- 36 CHEN, T.H.; FOSTER, L.E.; MEYER, K.F. Experimental comparison of the immunogenicity of antigens in the residue of ultrasonated avirulent *Pasteurella pestis* with a vaccine prepared with killed virulent whole organisms. **Journal of Immunology**, v. 87, p. 64-71, 1961.
- 37 CHROMY *et al.* Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 8172-8180, 2005.
- 38 CHU *et al.* A cryptic 19-kilobase plasmid associated with U.S. isolates of *Yersinia pestis*: a dimer of the 9,5-kilobase plasmid. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 679-686, 1998.
- 39 CUI *et al.* Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **PLoS One**, v. 3, e2652, 2008.
- 40 DARBY *et al.* *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. **Nature**, v. 417, p. 243-244, 2002.
- 41 DARBY, C. Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 158-164, 2008.
- 42 de BENITO C A polymorphic tandem repeat potentially useful for typing in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Microbiology**, v. 150, p. 199-204, 2004.
- 43 den DUNNEN, J.T.; van OMMEN, G.J. Methods for pulsed-field gel electrophoresis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 38, p. 161-177, 1993.
- 44 DENG *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 4601-4611, 2002.
- 45 DERBISE *et al.* A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 1145-1157, 2007.
- 46 DEVIGNAT, R. Geographical distribution of three species of *Pasteurella pestis*. **Schweizerische Zeitschrift für Pathologie und Bakteriologie**, v. 16, p. 509-514, 1953.

- 47 DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, p. 297-302, 1945.
- 48 EISEN *et al.* Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. **PNAS**, v. 103, p. 15380-15385, 2006.
- 49 EISEN, R.J.; GAGE, K.L. Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. **Veterinary Research**, v. 40, p. 1, 2009.
- 50 FERBER, D.M.; BRUBAKER, R.R. Plasmids in *Yersinia pestis*. **Infection Immunity**, v. 31, p. 839-841, 1981.
- 51 FETHERSTON, J.D.; SCHUETZE, P.; PERRY, R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. **Molecular Microbiology**, v. 18, p. 2693-2704, 1992.
- 52 FILIPPOV *et al.* Sequencing of two *Yersinia pestis* IS elements, IS285 and IS100. **Contributions to Microbiology and Immunology**, v. 13, p. 306-309, 1995.
- 53 GAGE, K.L.; KOSOY, M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 505-528, 2005.
- 54 GALIMAND *et al.* Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 677-680, 1997.
- 55 GAUTHIER *et al.* Transcriptional inhibitor of virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4101-4109, 2005.
- 56 GEHRING *et al.* The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. **Biochemistry**, v. 37, p. 11637-11650, 1998.
- 57 GIRARD, G.; ROBIC, J. Vaccination de l'homme contre la peste au moyen de germes vivants (virus vaccin EV). Premiers resultates acquis a Madagascar. **Bulletin Mensuel de l'Office International d'Hygiene Publique**, v. 28, p. 1078, 1936.

- 58 GRABENSTEIN *et al.* Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3727-3741, 2006.
- 59 GRANDIS *et al.* Deoxyribonucleic acid relatedness of serovars of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 49-55, 1988.
- 60 GUIYOULE *et al.* Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 43-48, 2001.
- 61 HACKER *et al.* Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 1089-1097, 1997.
- 62 HINNEBUSCH, B.J. The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, p. 197-212, 2005.
- 63 HINNEBUSCH, B.J.; ERICKSON, D.L. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 229-248, 2008.
- 64 HINNEBUSCH, B.J.; FISHER, E.R.; SCHWAN, T.G. Evaluation of the role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. **Journal of Infectious Disease**, v. 178, p. 1406-1415, 1998.
- 65 HUANG *et al.* Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1164-1173, 2002.
- 66 HUANG, X.Z.; LINDLER, L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of yersinia outer proteins and capsule antigen. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7212-7219, 2004.
- 67 HUNG *et al.* Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. **Science**, v. 310, p. 670-674, 2005.
- 68 HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

- 69 HURST *et al.* *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 844-849, 2011.
- 70 INGLESBY *et al.* Safety precautions to limit exposure from plague-infected patients. **JAMA**, v. 284, p. 1648-1649, 2000.
- 71 KAUPPI *et al.* Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. **Chemistry and Biology**, v. 10, p. 241-249, 2003.
- 72 KEIM *et al.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2928-2936, 2000.
- 73 KHAN, I.A. Plague: the dreadful visitation occupying the human mind for centuries. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 270-277, 2004.
- 74 KLEVYTSKA *et al.* Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3179-3185, 2001.
- 75 KOPP, E.; MEDZHITOV, R. A plague on host defense. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 1009-1012, 2002.
- 76 KUMARI *et al.* Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 881-885, 1997.
- 77 KUTYREV *et al.* Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1359-1367, 1999.
- 78 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 79 LATHAM *et al.* A plasminogenactivating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague pneumonia. **Science**, v. 315, p. 509-513, 2007.
- 80 LE FLÈCHE *et al.* A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, v. 1: p. 2, 2001.

- 81 LEAL *et al.* Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in brazilian *Yersinia pestis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 20-24, 2000.
- 82 LEAL *et al.* Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in Northeast Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 40-45, 2007.
- 83 LEAL, N.C. **Avaliação da PCR e hibridização com sondas moleculares como ferramentas para o diagnóstico e caracterização da *Yersinia pestis***. Recife: UFPE, 1998. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas.
- 84 LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 339-342, 1999.
- 85 LEAL-BALBINO *et al.* Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures *in vitro*: impact on virulence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 727-732, 2004.
- 86 LEAL-BALBINO *et al.* The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 126-131, 2006.
- 87 LEAL-BALBINO, T.C.; LEAL, N.C.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A.M.P. Peste e Tularemia. In: MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. cap. 5, p. 69-83.
- 88 LI *et al.* Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. **PLoS One**, v. 4, e6000, 2009.
- 89 LIGON, B.L. Plague: a review of its history and potential as a biological weapon. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 17, p. 161-170, 2006.
- 90 LINDLER, L.E. The *Yersinia pestis*-specific plasmids pFra and pPla. In: CARNIEL, E.; HINNEBUSCH, B.J. ***Yersinia*: molecular and cellular biology**. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004. cap. 3, p. 31-48.
- 91 LINDLER, L.E.; TALL, B.D. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 8, p. 311-324, 1993.
- 92 LOWELL *et al.* Identifying sources of human exposure to plague. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 650-656, 2005.

- 93 MAKOVEICHUK *et al.* pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 320-330, 2003.
- 94 MARCEAU, M. Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, p. 151-177, 2005.
- 95 MERHEJ *et al.* *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 779-784, 2008.
- 96 MOAYERI *et al.* Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2658-2665, 2006.
- 97 MOTIN *et al.* Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 6298-6305, 2004.
- 98 MURROS-KONTIAINEN *et al.* *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2368-2372, 2011b.
- 99 MURROS-KONTIAINEN *et al.* *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2363-2367, 2011a.
- 100 MUSCHIOL *et al.* A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, p. 14566-14571, 2006.
- 101 NAJDENSKI, H.; ITEMAN, I.; CARNIEL, E. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 32, p. 2913-2920, 1994.
- 102 NEUHOFF *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.
- 103 OLIVEIRA *et al.* The genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 2012. (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO).

- 104 OYSTON *et al.* The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3419-3425, 2000.
- 105 OYSTON, P. Plague virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 1015-1017, 2001.
- 106 OYSTON, P.C.F.; ISHERWOOD, K.E. *Yersinia*: an update. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 550-551, 2002.
- 107 PALMER, P.E.S.; REEDER, M.M. Plague. In:_____. **The Imaging of Tropical Diseases**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. cap. 24, p. 269-282.
- 108 PARKHILL *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. **Nature**, v. 413, p. 523-527, 2001.
- 109 PEREIRA *et al.* Análise dos dados de campo do Programa de Vigilância e Controle da Peste no Brasil, 2005-2010. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47., 2011, Natal. **Anais...** p. 0054.
- 110 PEREIRA, S.V.C.; VIEIRA, J.B.F. Epidemiological profile of plague in Brazil, 2000-2009. In: *Yersinia International Symposium*, 10., 2010, Recife. **Anais...** p. 58.
- 111 PERRY *et al.* DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4611-4623, 1998.
- 112 PERRY *et al.* Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 1638-1647, 2004.
- 113 PERRY, R.; FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 35-66, 1997.
- 114 PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29: e45, 2001.
- 115 POLLITZER, R. **Plague** (Monograph Series nº 22). Geneva: World Health Organization Monograph Series, 1954. v. 22, p. 11-45, 1954. 698 pp.

- 116 POUILLOT *et al.* Evaluation of O-antigen inactivation on Pla activity and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* harbouring the pPla plasmid. **Microbiology**, v. 151, p. 3759-3768, 2005.
- 117 POURCEL *et al.* Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **BMC Microbiology**, v. 4, p. 22, 2004.
- 118 PRENTICE *et al.* *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar typhi plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2586-2594, 2001.
- 119 PRENTICE, M.B.; RAHALISON, L. Plague. **Lancet**, v. 369, p. 1196-1207, 2007.
- 120 PROTSENKO, O.A.; FILIPPOV, A.A.; KUTYREV, V.V. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome. **Microbial Pathogenesis**, v. 11, p. 123-128, 1991.
- 121 RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 117-128, 2010.
- 122 REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.
- 123 REVAZISHVILI *et al.* Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 429-436, 2008.
- 124 REVELL, P.A.; MILLER, V.L. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 159-164, 2001.
- 125 ROCHA *et al.* Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa**, Comunicado Técnico nº 136, 2005.
- 126 ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.
- 127 RUSSELL *et al.* A comparison of plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. **Vaccine**, v. 13, p. 1551-1556, 1995.

- 128 SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
- 129 SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 83-94, 2004.
- 130 SEBBANE *et al.* Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 5526-5530, 2006.
- 131 SEBBANE *et al.* Role of the *Yersinia pestis* yersiniabactin iron acquisition system in the incidence of flea-borne plague. **PLoS One**, v. 5, e14379, 2010.
- 132 SHEN *et al.* Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 3551-3552, 2010.
- 133 SILVA, A.C.M. **Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do Estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS100**. Recife: CPqAM, 2004. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública.
- 134 SILVEIRA-FILHO, V.M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Pernambuco State, Brazil. Resumo de tese de mestrado - Genética/UFPE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 234, 2007.
- 135 SOBREIRA, M. **Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos**. Recife: UFPE, 2002. Tese de Doutorado em Genética.
- 136 SONG *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA research**, v. 11, p. 179-197, 2004.
- 137 SPRAGUE *et al.* *Yersinia similis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 952-958, 2008.
- 138 SRP. Serviço de Referência em Peste (CPqAM/Fiocruz). Comunicação pessoal, 2011.
- 139 STAGGS, T.M.; FETHERSTON, J.D.; PERRY, R.D. Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7614-7624, 1994.

- 140 STRALEY, S.C. Adhesins in *Yersinia pestis*. **Trends in Microbiology**, v. 1, p. 285-286, 1993.
- 141 STRALEY, S.C.; PERRY, R.D. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 310-317, 1995.
- 142 STYER *et al.* *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. **EMBO reports**, v. 6, p. 992-997, 2005.
- 143 SUN *et al.* *Yersinia pestis* with regulated delayed attenuation as a vaccine candidate to induce protective immunity against plague. **Infection Immunity**, v. 78, p. 1304-1313, 2010.
- 144 SUNTSOV, V.V.; SUNTSOVA, N.I. Macro- and microevolution as related to the problem of origin and global expansion of the plague pathogen *Yersinia pestis*. **Izvestiia Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya**, v. 4, p. 389-395, 2008.
- 145 SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica (Série A. Normas e Manuais Técnicos). 6. ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2005. 816 p.
- 146 SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância epidemiológica e controle da peste (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde, Brasília, 2008.
- 147 SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica 001. CDTV/CGDT/ DEVEP/SVS/MS. Reorientação estratégica das atividades de captura, coleta e exame de amostras de reservatórios, vetores e animais-sentinela, como parte da vigilância do Programa de Controle da Peste, 2007.
- 148 TAMURA *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- 149 TAN, L.; DARBY, C. A movable surface: formation of surface *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5087-5092, 2004.

- 150 TAVARES, C. **Análise do contexto, estrutura e processos que caracterizaram o Plano Piloto de Peste em Exu e sua contribuição ao controle da peste no Brasil.** Recife: CPqAM, 2007. Tese de Doutorado em Saúde Pública.
- 151 TENOVER *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical Microbiology**, v. 9, p. 2233-2239, 1995.
- 152 TITBALL, R.W.; OYSTON, P.C.F. A plague upon fibrin. **Nature Medicine**, v. 13, p. 253-254, 2007.
- 153 TOUCHMAN *et al.* A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. **PLoS One**, v. 2: e220, 2007.
- 154 TRACHTMAN *et al.* Effect of an oral *Shiga* toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 290, p. 1337-1344, 2003.
- 155 VALLONE, P.M.; BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, p. 226-231, 2004.
- 156 VEENENDAAL, A.K.; SUNDIN, C.; BLOCKER, A.J. Small-molecule type III secretion system inhibitors block assembly of the *Shigella* type III secretin. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 563-570, 2009.
- 157 VERGNAUD, G.; POURCEL, C. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis. In: STACKEBRANDT, E. **Molecular identification, systematics and population structure of prokaryotes.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. cap. 4, p. 83-104.
- 158 VIEIRA, J.B.; COELHO, G.E. Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 113-119, 1998.
- 159 VOGLER *et al.* Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1319, 2011.
- 160 WALSH C (2003) **Antibiotics: actions, origins, resistance.** Washington, DC: ASM Press. 335 pp.

- 161 WANDERLEI *et al.* Atual perfil epidemiológico da peste em Pernambuco: alerta para o programa de vigilância e controle. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47., 2011, Natal. **Anais...** p. 0413.
- 162 WHO - *World Health Organization*. Human plague in 2000 and 2001. **Weekly Epidemiological Record**, v. 78, p. 130-135, 2003.
- 163 WHO - *World Health Organization*. Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004-2009. **Weekly Epidemiological Record**, v. 85, p. 40-45, 2010.
- 164 WHO - *World Health Organization*. Plague in the Americas. **Scientific Publication**, v. 115, p. 44-68, 1965.
- 165 WHO - *World Health Organization*. **Plague manual**. Epidemiology, distribution, surveillance and control, 1999. 171p.
- 166 WRIGHT, J.S.3rd; JIN, R.; NOVICK, R.P. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, p. 1691-1696, 2005.
- 167 YOON *et al.* Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 753-767, 2003.
- 168 ZHANG *et al.* Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan Province of China. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 714-717, 2009.
- 169 ZHOU *et al.* Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5147-5152, 2004.
- 170 ZHOU, D.; YANG, R. Molecular Darwinian evolution of virulence in *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 2242-2250, 2009.

9. Anexos

9.1. Artigo aceito para publicação

Título: The genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil.

Autores: OLIVEIRA, Maria Betânia; BARROS, Maria Paloma Silva; SILVEIRA-FILHO, Vladimir da Mota; ARAÚJO-NEPONUCENO, Mirele Regina; BALBINO, Valdir de Queiroz; LEAL, Nilma Cintra; ALMEIDA, Alzira Maria Paiva; LEAL-BALBINO, Tereza Cristina.

Revista: Genetics and Molecular Research

Qualis CAPES 2012 - Ciências Biológicas I: B2

The Genetic Diversity of *Yersinia pestis* in Brazil

Brazilian *Y. pestis* diversity

M. B. M. Oliveira¹, M. P. S. Barros^{2,3}, V. M. Silveira-Filho^{2,3}, M. R. Araújo-Nepomuceno², V. Q. Balbino³, N. C. Leal², A. M. P. Almeida² and T. C. Leal-Balbino^{2,3}

1 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

2 Centro de Pesquisas Ageu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE), Recife, PE, Brasil

3 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: Tereza Cristina Leal-Balbino.

E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br; tcristinaleal@yahoo.com.br

ABSTRACT. Due to great genetic similarity among isolates molecular subtyping of *Yersinia pestis* has been difficult. Analysis of multiple-locus variable-number tandem repeats (VNTR), also known as MLVA, has become a valuable tool to discriminate among *Y. pestis* strains. To uncover any genetic difference, *Y. pestis* strains from two different ecological complexes in Brazil during two different epidemiological events, an epizootic in Sítio Alagoinha in 1967 and an outbreak in Planalto da Borborema in 1986 were subtyped through MLVA using 12 VNTR loci. Three clusters (A, B and C) were observed. Out of the 20 strains from the epizootic, 18 fit into cluster A. Cluster A was divided into two subgroups: A₁ (15 strains) and A₂ (3 strains). Out of the 17 strains from the outbreak, 15 fit into cluster B. Cluster B was divided into three subgroups: B₁ (4 strains), B₂ (4 strains) and B₃ (7 strains). Cluster C is a singleton with one epizootic strain. The external standards, *Y. pestis* CO92 and *Y. pseudotuberculosis* IP32853, formed two clusters of singletons. The stability of 12 VNTR loci of three unrelated cultures included in this study was assessed. The 12 VNTR loci were stable through multiple serial subcultures in the laboratory. MLVA revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic and demonstrated intraspecific genetic diversity among Brazilian plague strains. This analysis establishes a relative correlation among genetic groups, which is related to the temporal and geographic origin of the isolates.

Key words: Plague, molecular epidemiology, MLVA.

INTRODUCTION

The plague, caused by infection with *Yersinia pestis*, was introduced into Brazil by sea through infected rats and fleas conveyed on steam ships during the last pandemic, which originated in China in 1855. Records of the early history of the plague in Brazil are discontinuous and sparse, which makes detailed tracking difficult to impossible. Systematic information became available only after the 1930s (Pollitzer, 1954; Baltazard, 1968). Nevertheless, there is a general consensus that the first human case was registered in October 1899 in Santos, in São Paulo state. From then on, other coastal cities became successively infected. Government control measures were promptly undertaken, and the infection was eliminated from the coast; however, these measures did not stop the spread of the plague to inland cities, towns and villages. The plague reached rural areas, afflicting small districts, farms and ranches. The plague then established many natural foci among the wild rodents in several ecological complexes, from the State of Ceara to the north of Minas Gerais (collectively named the Northeast focus) and in the Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro (WHO, 1965; Baltazard, 1968).

Tight control of the plague in the 1930s reduced human cases and mortality. Unfortunately, this program was interrupted, and the disease reemerged in the 1960s. To achieve new insights into the features of plague epidemiology and to reorganize an effective control strategy, an extensive project comprised of field and laboratory research was established and carried out from 1966-1974 (Baltazard, 2004). By the end of the project, more than 600 *Y. pestis* strains were isolated, which resulted in a unique collection of *Y. pestis* cultures in Brazil. Subsequent epidemiological investigations and surveillance activities in northeastern Brazilian plague areas expanded this collection (Rocha et al., 2009). The collection is now maintained by the National Service for Reference in Plague of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM), Recife-PE and linked to FIOCRUZ culture collections (Fiocruz-CYP).

Attempts have been made to genotype many of these isolates. In almost every case, no differences between isolates were found, even across multiple host species, different geographic origins, or years (unpublished results). Molecular subtyping of *Y. pestis* for epidemiological tracking has been difficult due to great genetic similarity among isolates (Vogler et al., 2011). However, analysis of multiple-locus variable-number tandem repeats (VNTR), also known as MLVA, has become a valuable tool to discriminate among *Y. pestis* strains. Using MLVA, it is possible to trace the dispersion routes of bacterial populations at the local, regional and global levels (Adair et al., 2000; Klevytska et al., 2001; Achtman et al., 2004; Girard et al., 2004; Pourcel et al., 2004; Lowell et al., 2005; Vogler et al., 2011).

In the present work, we analyzed *Y. pestis* strains from two different ecological complexes in Brazil during two different epidemiological events. MLVA using 12 VNTRs revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic. We also demonstrated intraspecific genetic diversity among the strains, which establishes a relative correlation among genetic groups and the temporal and geographic origin of the isolates.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains studied

The study involved 37 *Y. pestis* strains that were kindly provided by the Fiocruz-CYP culture collection, which is maintained by the SRP/CPqAM-FIOCRUZ/PE. Twenty strains were isolated from rodents and fleas during an epizootic in August 1967. This epizootic occurred in Sitio Alagoinha, a locality situated in Chapada do Araripe, Pernambuco state (Almeida et al., 1985). Seventeen strains were isolated from an outbreak in 1986, which involved several municipalities in Planalto da Borborema, Paraíba state (Almeida et al., 1989). Three unrelated strains (P. CE 882, P. Exu 340 and P. Peru 375) and 11 derived cultures obtained through multiple serial subcultures of the parental strains (Leal-Balbino et al., 2004) were included to assess *in vitro* VNTR stability. Figure 1 shows the localization of the Brazilian plague foci and origin of the strains.

Epizootic strains are identified as P (plague), Exu (laboratory city), and sequential number. Outbreak strains are identified as P (plague), PB (state of origin) and sequential number.

Culture conditions

Cultures were maintained in peptone agar stab at 4°C. The strains were inoculated into brain heart infusion broth at 28°C and inspected daily for up to seven days. Each culture grown during this period was plated in blood agar base, incubated at 28°C and analyzed on a daily basis for up to five days to assess the morphology of the developing colonies. Identification of the culture and confirmation of purity were carried out by the plague phage test (Karimi, 1978).

VNTR primers

Primers designed to amplify the 12 chromosomal VNTRs published by Adair et al. (2000), Le Flèche et al. (2001) and Klevytska et al. (2001) were used for PCR amplification in the *Y. pestis* cultures. It should be pointed out that some loci were given different names by different authors. In this paper, the standardized nomenclature from Pourcel et al. (2004) was used. A description of the primers and references is presented in Table 1.

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was prepared as described by Souza et al. (2007). The PCR reactions were carried out in a final volume of 25 µL that contained 20 ng DNA, 20 pmol of each primer, 50 mmol KCl, 20 mmol Tris-HCl pH 8.0, 0.16 mmol deoxynucleoside triphosphates (dNTPs, Invitrogen, Brazil), 1.5 mmol MgCl₂, and 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Brazil).

The amplification of locus 1AB was carried out as described by Adair et al. (2000). The amplification of the other loci was carried out according to Le Flèche et al. (2001). The amplicons were separated by electrophoresis with 3.0% agarose gels in Tris-borate at 100 V and were stained with ethidium bromide (1 µg/mL). The images were captured under UV using 1D Image Analysis software version 3.5 (Kodak Digital Science, New Haven, CT, USA). A 50-bp DNA ladder (Invitrogen, Brazil) was used as a standard.

Cluster analysis

The imaging software 1D Image Analysis (version 3.5; Kodak Digital Science, New Haven, CT, USA) was used to determine the size of the amplicons. The number of repeat units (NRU) for each locus was determined using the following formula, which we inferred from Adair et al. (2000): $NRU = A_S - FR_S / RU_S$, where A_S is the amplicon size, FR_S is the size of the flanking region sequence and RU_S is the size of each repeat unit. FR_S and RU_S were identified through *in silico* analysis of the *Y. pestis* CO92 genome sequence with the Tandem Repeats Finder software (Benson, 1999). The Li et al. (2009) standardized nomenclature was used for all loci, except for ms30 (Le Fleche et al., 2001) and 1AB (Adair et al., 2000).

One representative amplicon of each VNTR was sequenced to confirm the size of the repeat and the copy number. Due to their small size (4 bp), all the amplicons generated with primer 1AB were sequenced to confirm the repeat size and copy number. For clustering analyses, the categorical coefficient and Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) were used. The use of the categorical parameter assumes that the character states are unordered. The same weight is given to a large or a small number of differences in the number of repeats at each locus. The UPGMA tree was constructed using MEGA v. 5.0 (Tamura et al., 2011).

MLVA patterns were normalized using *Y. pestis* CO92 (GI:30407161) and *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (GI:51594359) public genomic data as external standards.

Discriminatory analysis

The numerical discriminatory index (*DI*) of each VNTR locus was evaluated using the Hunter and Gaston formula (1988): $DI = 1 - [1 / N(N - 1)] \sum nj(nj - 1)$, where N is the total number of isolates in this population, and nj is the number of isolates representing each type. This approach is based on the probability that two unrelated strains from the tested population will be placed into different groups.

Sequencing

For sequencing, the amplicons were purified with the Purelink PCR purification kit (Invitrogen, Brazil), following the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed with the same primers used for PCR. An ABI 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) and the BigDye Kit (Applied

Biosystems) were used for sequencing. The Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) (Altschul et al., 1997) was used to confirm the identity of the sequenced amplicons by comparing them against the NCBI databank of non-redundant nucleotide sequences. Seq Tools 8.3.022 (Rasmussen, 2002) and Bio Edit v. 7.0.5.2 (Hall, 1999) were used to edit the generated sequences.

The sequences were submitted to and published in the GenBank database under the following accession numbers: 1AB (GI:89112565); ms04 (GI:238867221); ms05 (GI:238867222); ms06 (GI:89112563); ms07 (GI:238867223); ms09 (GI:238867224); ms20 (GI:238867225); ms30 (GI:238867226); ms45 (GI:238867227); ms46 (GI:238867228); ms54 (GI:238867229); and ms62 (GI:238867230). The copy number variation of the VNTR loci was determined with the Tandem Repeats Finder tool (Benson, 1999) using the basic alignment parameters described on the homepage of the software (accessible at <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

RESULTS

MLVA based on 12 VNTR chromosomal loci was used to subtype two sets of *Y. pestis* strains originated from two different ecological complexes in Brazil during two different epidemiological events, an epizootic in Sitio Alagoinha in 1967 (20 strains) and an outbreak in Planalto da Borborema in 1986 (17 strains).

The primers directed to the 12 VNTRs yielded PCR products in all the cultures tested, which means that the loci were all present in the analyzed strains. MLVA was also completed on the 12 loci in the parental strain and their derivatives obtained by multiple serial subcultures of P. CE 882, P. Peru 375 and P. Exu 340 strains. Identical patterns were revealed in the parental and derived cultures (data not shown).

Out of the 12 VNTR loci analyzed in the 37 outbreak and epizootic strains, seven (ms04, ms05, ms06, ms07, ms20, ms45 and ms62) revealed polymorphisms. These seven displayed differences in amplicon length and copy number, with a *DI* ranging from 0.4 to 0.9. Strains from the two groups shared at least one allele in each locus. Five VNTRs revealed a monomorphic pattern: ms09 (20 repeats), ms30 (08), ms46 (04), ms54 (05) and 1AB (10) (Figures 2 and 3).

Using a cut-off value of 2.5 differences, the 37 epizootic and outbreak strains were separated into three distinct clusters (A, B and C). The external standards, *Y. pestis* CO92 and *Y. pseudotuberculosis* IP32853, formed two distinct singletons (Figure 4). Cluster A was divided into two subgroups: A₁ (15 strains) and A₂ (5 strains). Cluster B was divided into three subgroups: B₁ (4 strains), B₂ (5 strains) and B₃ (7 strains). Cluster C is a singleton (Figure 4).

Cluster A, which was the dominant cluster, grouped all but two epizootic strains and included 2 outbreak strains (P. PB 866 and P. PB 869). Subgroup A₁ was specific for the epizootic strains and included most of them: *Necromys lasiurus* (9), *Polygenis bolshi jordani* (4), *Rattus rattus* (1), and *Xenopsylla cheopis* (1). Subgroup A₂ included 3 epizootic strains: *N. lasiurus* (1), *P. b. jordani* (1), and *R. rattus* (1). Subgroup A₂ also included 2 outbreak strains: *Holochilus sciureus* (1) and *R. rattus* (1) (Figure 4).

Cluster B included all but two outbreak strains plus one epizootic strain. Subgroups B₁ and B₃ were exclusively composed of outbreak strains. Subgroup B₁ included strains from *R. rattus* (1), *Oryzomys subflavus* (1) and human (1); subgroup B₃ included strains from: *N. lasiurus* (4), *O. subflavus* (2) and human (1). Subgroup B₂ included outbreak strains from: *R. rattus* (2), *N. lasiurus* (1) and *O. subflavus* (1); and one epizootic strain from one *N. lasiurus* (Figure 4).

Some strains from the wild host, the rodent *N. lasiurus*, and its flea vector, *P. b. jordani*, e.g., P. Exu 33/P. Exu 36, P. Exu 53/P. Exu 59, P. Exu 31/P. Exu 35 and P. Exu 40/P. Exu 44 were closely related. These strains only differed at one to three loci. The two epizootic strains unaffiliated with cluster A fit one different cluster each: B₂ (P. Exu 42) and C (P. Exu 47) (Figure 4).

DISCUSSION

Studies on the molecular epidemiology of *Y. pestis* had been hampered due to the great similarity of isolates. However, new molecular approaches are uncovering a relatively high level of genetic diversity. The global expansion of *Y. pestis* strains from central Asian plague foci was demonstrated by Li et al. (2009) with an MLVA of 25 VNTRs. MLVA was also successfully employed to study the maintenance and spread of *Y. pestis* in Madagascar (Vogler et al., 2011).

In the present work, a phylogenetic analysis based on 12 VNTRs was performed on *Y. pestis* strains from two different epidemiological events in two Brazilian northeastern plague areas: an epizootic in Chapada

do Araripe, Pernambuco state (Almeida et al., 1985) and an outbreak in Planalto da Borborema, Paraíba state (Almeida et al., 1989).

In Pernambuco state, plague was registered for the first time in 1902 in the docks of Recife, the capital city. Plague is suspected of spreading via transportation of cargo and reached Chapada do Araripe in 1919, establishing one of the most active plague foci in Brazil (WHO, 1965; Baltazard, 2004). MLVA performed on 20 strains from an epizootic in Sítio Alagoinha, a small property located at Chapada do Araripe in 1967, allowed us to distinguish two subgroups (Figure 4). Most of the strains (75%) fit into subgroup A₁, suggesting that they were all from a single “epizootic path”. This subgroup assembled strains from the wild rodent, *N. lasiurus*, and its fleas (*P. b. jordanii*). This subgroup also included strains from the commensal rat (*R. rattus*) and the rat flea, *X. cheopis*, collected on the ground inside the houses.

After studies on the ecology of plague in the Chapada do Araripe focus, Baltazard (2004) concluded that *Y. pestis* progresses as individual “epizootic paths”. These “paths” wind their way randomly in short incursions through the fields, exterminating the populations of afflicted rodents. Given the extreme sedentary nature of rodents and the small radius of their excursions, such “epizootic paths” progress slowly and cover very small areas. Each “path” winds its way through the fields autonomously. This behavior could explain the presence of a dominant MLVA genotype among different species of rodents and fleas from the epizootic in a small area.

According to Baltazard (2004), the field rodent *N. lasiurus* and its fleas (*Polygenis* spp.) are by far the most frequently infected species in the wild and play an important role in plague amplification. However, other species of rodents and fleas are also involved. Our results provide further evidence of *Y. pestis* interchange between wild rodent hosts and the commensal rat and their fleas in Brazilian foci.

In Paraíba state, plague was first registered in 1912. In September 1986, after a quiescent period of 10 years, an outbreak emerged. This outbreak spread quickly throughout 41 municipalities and affected humans and several species of rodents from many localities on the Planalto da Borborema (Almeida et al., 1989). MLVA distinguished three subgroups (B₁, B₂ and B₃) among the analyzed outbreak isolates. Thus, it appears that distinct *Y. pestis* populations (the multiple “epizootic paths”) circulated in the area during the outbreak. According to Baltazard (2004), when the rodent population density is high, each “epizootic path” extends and crosses and crisscrosses the other “paths”. This pattern continues until the rodent population climaxes. The epizootic can then spread over vast areas, reaching all species, and then human cases arise. Most of the outbreak strains (41.2%) clustered in subgroup B₃ and one human strain (P. PB 862) clustered with two *N. lasiurus* strains isolated from the same locality.

These different *Y. pestis* populations described in the present work may reflect microevolution of the invading strain due to environmental pressure experienced while spreading inland from the coast. Alternatively, the strains could be inaccurate representatives of the original isolates, and these differences could be due to handling procedures during the prolonged storage of the strains in the laboratory since their isolation (Revazishvili et al., 2008; Vogler et al., 2011). Leal et al. (2000) and Leal-Balbino et al. (2004, 2006) observed spontaneous changes in the genome (both plasmid and chromosomal) of Brazilian *Y. pestis* following prolonged storage and laboratory handling. However, analysis of the 12 VNTR loci in the three parental strains and their derived cultures did not reveal changes in the studied regions, confirming their stability as previously observed (Adair et al., 2000; Keim et al., 2000). Furthermore, according to Vogler et al. (2011), the rate of VNTR evolution in the laboratory, even with passaging, should be much slower than in nature. While these isolates may not be exactly the same as when they were first isolated, they should be quite similar to the original isolates.

In Brazil, all the plague foci have been mostly dormant since the mid-1980s. The occurrence of new cases has been rare, and the last cases were in 1997 and 2005 in Ceará. However, serological surveys continuously detect plague antibodies on sentinel animals in plague areas (Leal and Almeida, 1999; Aragão et al., 2009), suggesting that these plague foci remain active and may reappear (Duplantier et al., 2005; Gage and Kosoy, 2005; WHO, 2006, 2010; Stenseth et al., 2008).

Brazilian plague foci are autonomous, i.e., totally independent of each other, and there is no connection between them. They have different epidemiological characteristics and patterns of disease manifestations in the human population. The foci have alternating periods of high incidence followed by other periods of low incidence or even the absence of cases (Baltazard, 2004; Giles et al., 2011). The presence of similar genotypes separated by long geographical and temporal distances as in the A₂ and B₂ subgroups remains to be explained.

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

all the known Brazilian foci and strains isolated in different epidemiological periods may reveal the dispersion of the different *Y. pestis* “paths.”

In conclusion, MLVA based on 12 VNTRs revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic and demonstrated intraspecific genetic diversity among Brazilian plague strains. This work establishes a relative correlation for the first time among genetic groups based on the temporal and geographic origin of the Brazilian isolates. The knowledge of local strains characteristics will be of great assistance to elucidate the origin of new strains, if by natural foci emergence, reemergence or coming from other countries.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silvana Santos from the Department of Microbiology of CPqAM for technical assistance. Research supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico): Edital MCT/CNPq 14/2009 – Universal, Processo Nº 482694/2009-2 and SRP/CPqAM-FIOCRUZ.

REFERENCES

- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, et al. (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 17837-17842.
- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, et al. (2000). Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG and Almeida CR (1985). Isolation of *Yersinia pestis* in plague foci of Northeast Brazil from 1966 to 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 27: 207-218.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, et al. (1989). Bacteriological and serological studies of a plague outbreak in the Paraíba, State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 84: 249-256.
- Altschul SF, Maden TL, Schaffer AA, Zhang J, et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane ACM, Tavares C, et al. (2009). Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos, do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42: 711-715.
- Baltazard M (1968). Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Rev. Bras. Mal. D. Trop.* 20: 335-366.
- Baltazard M (2004). 4^e rapport (mai 1970) – Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 97 (supplément): 93-117.
- Benson G (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 5: 573-580.
- Duplantier J, Duchemin J, Chanteau S and Carniel E (2005). From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Vet. Res.* 36: 437-453.
- Gage KL and [javascript:void\(0\);](#) Kosoy MY (2005). Natural history of plague: Perspectives from More than a Century of Research. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 505-528.
- Giles J, Peterson AT and Almeida A (2011). Ecology and Geography of Plague Transmission Areas in Northeastern Brazil. *Plos Neglect. Trop. D.* 5: e925.
- Girard JM, Wagner DM, Vogler AJ, Keys C, et al. (2004). Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional and global scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8408-8413.
- Hall TA (1999). Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hunter PR and Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Karimi Y (1978). Rapid laboratory diagnosis of plague. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 71: 45-48.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, et al. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182: 2928-2936.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, et al. (2001). Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3179-3185.
- Leal NC and Almeida AMP (1999). Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41: 339-342.
- Leal NC, Sobreira M, Leal TCA and Almeida AMP (2000). Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis*. *Braz. J. Microbiol.* 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CV and Almeida AM (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99: 727-732.

- Leal-Balbino TC, Leal NC, Nascimento MGM, Oliveira MBM, et al. (2006). The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genet. Mol. Biol.* 29: 126-131.
- Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, et al. (2001). A tandem repeats database of bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 1: 2.
- Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, et al. (2009). Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *Plos One* 22: e6000.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, et al. (2005). Identifying sources of human exposure to plague. *J. Clin. Microbiol.* 43: 650-656.
- Pollitzer R (1954). History and present distribution of plague in: plague. *Monogr. Ser. World Health Organ.* 22: 11-45.
- Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, et al. (2004). Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 8: 4-22.
- Rasmussen SW (2002). SEQtools, a software package for analysis of nucleotide and protein sequences. <http://www.seqtools.dk>
- Revazishvili T, Rajanna C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, et al. (2008). Characterization of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 429-436.
- Rocha SS, Almeida AMP, Leal NC, Cordeiro MT, et al. (2009). Biological collections from Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation: analysis of a workshop. *Rev. Pat. Trop.* 38: 299-309.
- Souza G, Abath F, Leal N, Farias A, et al. (2007). Development and evaluation of a Single Tube Nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. In Perry RD, Fetherston JD. The Genus *Yersinia*: From Genomics to Function, *Springer*, New York: 351-359.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, et al. (2008). Plague: Past, Present and Future. *Plos Med.* 5: e3.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, et al. (2011). Phylogeography and Molecular Epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Plos Negl. Trop. Dis.* 5: e1319.
- WHO (1965). Plague in the Americas. *Scient. Public. World Health Organ.* 115: 44-68.
- WHO (2006). International meeting on prevention and controlling plague: the old calamity still has a future. *Scient. Public. World Health Organ.* 80: 278-284.
- WHO (2010). Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004-2009. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 85: 40-45.

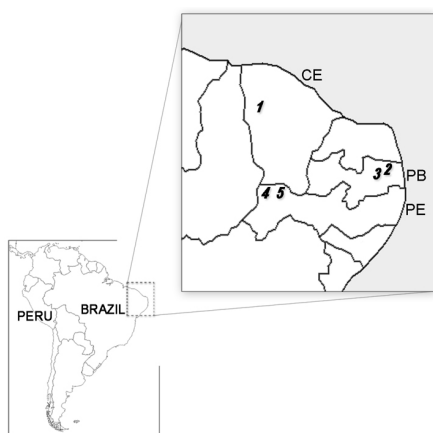
FIGURE CAPTIONS

Figure 1. The geographic origin of the *Yersinia pestis* strains analyzed. Abbreviations: CE: Ceará (1: Ipu); PB: Paraíba (2: Solânea, 3: Remígio); and PE: Pernambuco (4: Ipupi, 5: Exu).

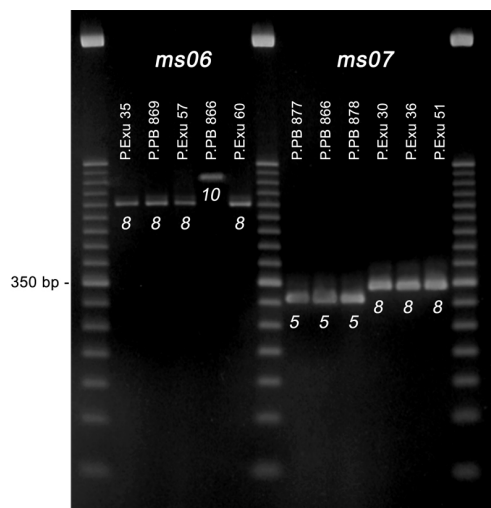


Figure 2. Analysis of PCR products by 3.0% agarose gel electrophoresis to determine repeat size polymorphisms at the ms06 and ms07 loci. The number of repeats is indicated under each amplicon.

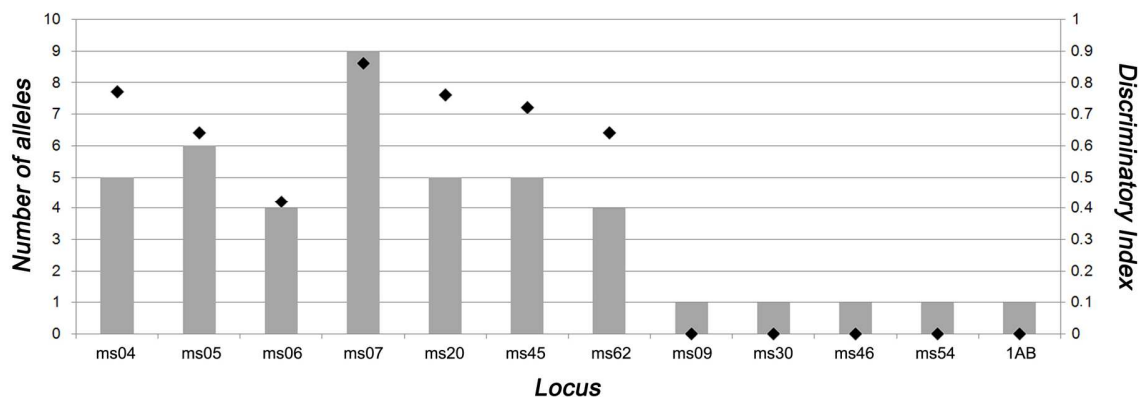


Figure 3. The distribution of the number of alleles (bars) and the discriminatory index (markers) found among the 12 VNTRs.

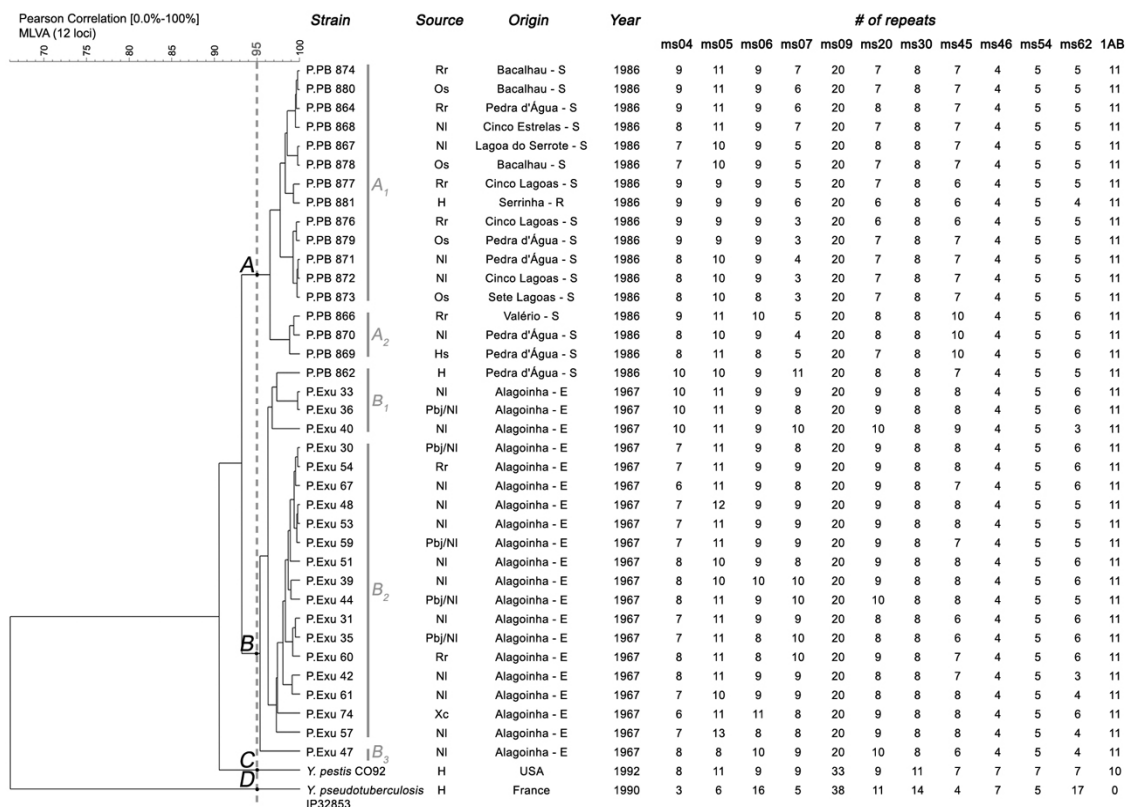


Figure 4. UPGMA dendrogram showing clustering and correlation of the *Yersinia pestis* strains studied with their origin and distribution by groups. Abbreviations: H: human; Hs: *Holochilus sciureus*; Nl: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Xc: *Xenopsylla cheopis*; Pbj/Nl: *Polygenis bolshi jordani* from *N. lasiurus*; S: Solânea; E: Exu; and R: Remígio.

Table 1. Sequences and description of the primers used to analyze the 12 VNTR loci in *Yersinia pestis* strains.

Locus*	Alias	Primer sequence	Repeat Unit	Reference for primer
ms04	M58	(F) 5'-GCG ATA ACC CAC ATT ATC ACA ATA ACC AAC AC-3' (R) 5'-GCT GAT GGA ACC GGT ATG CTG AAT TTG C-3'	17 bp	Klevytska et al. (2001)
ms05	M59	(F) 5'-GCT TAG CCG CCA GAA AAG GTG AGT TGG C-3' (R) 5'-GAT AAT GGC GGT AGC CGG AAT CTG ATA ATC ATC-3'	17 bp	Klevytska et al. (2001)
ms06	-	(F) 5'-AAT TTT GCT CCC CAA ATA GCA T-3' (R) 5'-TTT TCC CCA TTA GCG AAA TAA GTA-3'	60 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms07	M37	(F) 5'-GCC ACA GGA AGA GGA CAT TTC AGA GAA AAC-3' (R) 5'-GTT GCT AAA ACG ATA CCG CTA CGA TCA GC-3'	10 bp	Klevytska et al. (2001)
ms09	-	(F) 5'-CGT TAC CCT TGT TGC CAA TAG T-3' (R) 5'-ACG CAG AAC ATG CTT ACC TTT TAT-3'	18 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms20	M51	(F) 5'-GCA ACC CGC TGA AGT TGT AAA AAC CGA C-3' (R) 5'-GCG TTG ATC TTC GCG GCC TTC AC-3'	15 bp	Klevytska et al. (2001)
ms30	-	(F) 5'-CAA TAA TAC CAT CGT GCG TGA TAC-3' (R) 5'-TAT TAA TGG TGG TGT TAG TCG CTG T-3'	54 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms45	M42	(F) 5'-GCC GGT AGA GGC GTT GTC TTT GGT TTT TTC-3' (R) 5'-GTT TTG GGG TTC AGT GCA CGC TTG TGA C-3'	12 bp	Klevytska et al. (2001)
ms46	-	(F) 5'-CAG GTT TTA CGT TAT TTT CTG AAG G-3' (R) 5'-CAG CAT GAA GTA TGA CGG GTA TAT TA-3'	17 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms54	-	(F) 5'-GTC CAC CAT TTT CAT ACT GTC ACT T-3' (R) 5'-GCT CTT TGT TCG ATT TTA TTG AAT G-3'	22 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms62	M34	(F) 5'-GAA TCG CGG GTT GAC GCT GTT GAG C-3' (R) 5'-GCT GAA CAG CCC CAT AAA ACC GGA GC-3'	9 bp	Klevytska et al. (2001)
1AB	-	(F) 5'-GGT TAG GTA GGG TGT TGA AG-3' (R) 5'-AAA GAG GCT AAG TGG CAA-3'	4 bp	Adair et al. (2000)

* Nomenclature as outlined in Pourcel et al. (2004).

9.2. Artigo em revisão

Título: Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed field gel electrophoresis.

Autores: BARROS, Maria Paloma Silva; SILVEIRA-FILHO, Vladimir da Mota; LINS, Rosanny Holanda Freitas Benevides; OLIVEIRA, Maria Betânia Melo; ALMEIDA, Alzira Maria Paiva; LEAL-BALBINO, Tereza Cristina.

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Qualis CAPES 2012 - Ciências Biológicas I: B1

Running headline: *Yersinia pestis* subtyping

Title: Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by Pulsed Field Gel Electrophoresis

Authors: Maria Paloma Silva de Barros^{1,2}, Vladimir da Mota Silveira-Filho^{1,2}, Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins¹, Maria Betânia Melo de Oliveira³, Alzira Maria Paiva de Almeida¹, Tereza Cristina Leal-Balbino^{1,2}

1 Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Recife, PE, Brazil.

2 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

3 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Corresponding author:

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE). Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. 50670-420. Tel: 55-81-2101.2696. Fax: 55-81-2101.2647. E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br; tcristinaleal@yahoo.com.br

ABSTRACT. In this study we performed a subtyping of Brazilian *Yersinia pestis* strains by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The stability of the PFGE profiles was investigated by the analysis of serial subcultures of three strains. Each strain exhibited a unique PFGE profile and derived cultures revealed the same parental profile. The technique's reproducibility was evaluated by PFGE repeats and identical profiles were generated in the three assays in the same strain. Studies carried out on 22 Brazilian *Yersinia pestis* strains: 17 from an outbreak and five from endemic routine surveillance divided the strains into 2 groups (I - II), 8 subgroups (A - H) and 19 PFGE profiles or pulsotypes. PFGE did not separate outbreak from non-outbreak strains for identical pulsotypes patterns were found among outbreak strains as well as in those obtained during surveillance activities yet it was able to reveal intraspecific genetic diversity in the samples studied which will contribute for future in-depth epidemiological studies.

Keywords: *Yersinia pestis*; Molecular Epidemiology; Pulsed Field Gel Electrophoresis

Financial support: CNPq, SRP/CPqAM-Fiocruz-PE

INTRODUCTION

Yersinia pestis is the causative agent of plague, a zoonotic disease of rodents, mainly transmitted to humans by infected flea bites. After three major pandemics responsible for millions of deaths, the zoonosis still occurs in South and North America, Asia and especially in Africa. Currently, it is considered as a reemerging disease and the agent is classified as class 3 biohazard and category A bioterrorism (Perry & Fetherston 1997, Stenseth et al. 2008).

Y. pestis was introduced to Brazil by sea route during the third Pandemic, in 1899, and established among the native rodents in rural areas in several ecological complexes (WHO 1965, Baltazard 2004). Apart from sporadic epidemics, from 20 to 100 cases were annually reported until the mid-1980s, when all the foci tended to quiescence (WHO 2006). During a plague outbreak in September 1986 in the Chapada da Borborema focus (Paraíba State) in the northeastern region (Fig. 1) 20 *Y. pestis* strains were isolated from humans (3) and (17) rodents: *Rattus rattus* (6), *Necromys lasiurus* (6), *Oryzomys subflavus* (4) and *Holochillus sciurus* (1) species (Almeida et al. 1989). These cultures are deposited in the *Yersinia* spp Collection (Fiocruz – CYP) maintained by the National Service for Reference in Plague from the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE (SRP/FIOCRUZ-PE), Recife, PE, Brazil (Rocha et al. 2009). The strains revealed homogenous regardless their origin concerning their plasmid content (Leal et al. 1989, Leal et al. 2000), outer membrane protein profile (Abath et al. 1989), RAPD and PCR – ribotyping analysis (unpublished results). Actually studies on the molecular epidemiology of *Y. pestis* had been hampered due to the great similarity of isolates (Vogler et al. 2011). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a highly discriminatory and versatile method and has been used in bacterial epidemiological and evolutionary studies and it proved useful for molecular subtyping of many bacteria whereas other molecular methods showed low discriminatory ability (Tenover et al. 1995).

The purpose of this study was to perform molecular subtyping by PFGE of Brazilian *Y. pestis* strains: 17 from an outbreak and five from endemic routine surveillance. Results demonstrated intraspecific genetic diversity in the samples studied and may contribute for future in-depth epidemiological studies.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Two sets of *Y. pestis* strains from the Fiocruz – CYP collection (SRP/FIOCRUZ-PE), Recife, PE, Brazil): 17 from the 1986 outbreak in the Paraíba State, Brazil (Almeida et al. 1989) and five from the endemic area routine plague program surveillance from 1978-1982 (Almeida et al. 1985) (Table I). They are maintained in peptone agar stab tubes at 4°C in a biosafety level 3 laboratory (BSL3). Outbreak strains were identified as P (plague), PB (state of origin), and sequential number. Other strains were identified as P (plague), Exu (laboratory location), and sequential number.

Three unrelated strains (P. Exu 340, P. Peru 375, P. CE 882) and five derived cultures obtained through multiple serial subcultures of the parental strains (Leal-Balbino et al. 2004) were included to assess stability of PFGE profiles with subcultures. The technique's reproducibility was evaluated by PFGE analysis of the strain P. EXU 866 three times. All the *Y. pestis* strains studied belong to biovar Orientalis (glycerol negative and nitrate positive) on the basis of their abilities to ferment glycerol and to reduce nitrate primary determinants in assigning biotype (Perry & Fetherston 1997).

For the work the cultures were inoculated into Brain Heart Infusion Broth (BHI, Himedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, India) and incubated at 28°C up to seven days. The cultures growth were confirmed by the plague phage test (Karimi 1978), plated on Blood Agar Base (BAB, Himedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, India) and incubated at 28°C up to five days.

PFGE protocol

The genomic DNAs of the *Y. pestis* strains were prepared in agarose plugs following a CDC Pulsenet protocol based (www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm), with a few modifications. *Y. pestis* cells grown on BAB plates for 48 h at 28°C were suspended into cell suspension buffer (CSB: 100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) and adjusted to 1.0 absorbance at 600 nm in spectrophotometer (Biotech Photometer, WPA, Cambridge, UK). 2% Pulsed-Field Certified Agarose Bio-Rad (Hercules, CA, USA) was used for genomic DNA plugs preparation. Cell lysis within agarose plugs was carried out on lysis buffer (CLB: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) at 54°C for 2 h under constant and vigorous shaking. Digestion was carried out at 37°C with the *AscI* enzyme (20 U/μl) at 37°C for 6 h in the enzyme buffer supplied by the manufacturer. Restricted plugs were washed at 50°C with sterile ultrapure water (x2) and TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) (x4), 10 min each. Digested fragments were separated using CHEF-DR III, Bio-

Rad system (Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields / Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 1% Seakem Gold agarose (Lonza, Rockland, ME, USA) gels and running buffer 0.5% TBE at 14°C with a ramping time of 4.5 V/cm during 22 h.

Lambda PFGE marker (New England BioLabs, Country RD Ipswich, MA, USA) was the molecular weight standard. Ethidium bromide (1 µg/ml) stained bands were visualized under UV and the images captured by the 1D Image Analysis Software, version 3.5 (Kodak Digital Science, New Haven, CT, USA).

PFGE pattern analysis

Strains were categorized indistinguishable (no difference), closely related (1-3 bands difference), possibly related (4-6 bands difference) and not related or different (> 6 bands difference) according to Tenover et al. (1995). BioNumerics software program (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium) was used to determine the presence or absence of bands and the similarity between samples was inferred using BioNumerics program version 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium). A dendrogram based upon PFGE data, was constructed by Dice's, using UPGMA at 1.5% tolerance and the PFGE protocol discriminatory ability was determined by Simpson's diversity index (discrimination index [D]) (Hunter & Gaston 1988).

RESULTS

PFGE protocol performance

Discriminatory ability

PFGE protocol revealed highly efficient to discriminate between *Y. pestis* strains (Simpson's index of diversity, 0.93). *AscI* restriction generated neat and clear bands. DNA fragments ranging from 50 to 300 kb were considered for analysis. Strains differentiate by one to three bands (Fig. 2). The dendrogram based upon PFGE divided the strains into two clusters or groups (I-II) at 70% cutoff similarity, eight subgroups (A-H) at 80% cutoff similarity and allowed distinguishing 19 PFGE profiles or pulsotypes (Fig. 2). Cluster I grouped together seven samples (one human and six outbreak and non-outbreak rodent strains) subdivided into two subgroups (A-B) and six PFGE profiles or pulsotypes. Cluster II grouped together 15 isolates (one human and 14 outbreak and non-outbreak rodent strains) subdivided into six subgroups (C-H) and 13 PFGE profiles or pulsotypes. All (A-G subgroups) but subgroup H includes two to four isolates (19 PFGE profiles or pulsotypes) (Fig. 2).

PFGE profiles stability and technique reproducibility

The stability of the PFGE profiles was investigated by the analysis of serial subcultures of the strains P. Exu 340, P. Peru 375 and P. CE 882. Each strain exhibited a unique PFGE profile and derived cultures revealed the same parental profile (Fig. 3). The technique's reproducibility was evaluated by repeating the PFGE analysis of the strain P. EXU 866 three times and identical profile was generated in the three assays (data not shown).

Host distribution

Different pulsotypes were found in strains from identical hosts: the two human strains displayed one pulsotype each (A4, E2) and with a few exceptions rodent strains also displayed one pulsotype each e.g.: two *R. rattus* from Sitio Cinco Lagoas/Solanea (A2, F1) and two *N. lasiurus* from Sit. Pedra d' Agua/Solanea (C1, H).

Identical pulsotypes occurred only twice among identical rodent sources: pulsotype A1 among two *O. subflavus* and G1 among two *N. lasiurus* but from different counties and year (Fig. 2).

Spatial distribution

Different pulsotypes were found in strains from the same geographic area. Outbreak strains came from eight rural sites (called sitios or farms) from two municipalities or counties (Fig. 1) and non-outbreak strains from five sites from two municipalities. Most of the strains analyzed (16) were from seven sites from Solanea (Fig. 1) and distributed among seven subgroups (A-D; F-H) and 15 pulsotypes (Fig. 2).

Human and rodent outbreak strains from the same place did not match e.g.: one human and five rodent strains from Sitio Pedra d' Agua/Solanea displayed six pulsotypes (A4, B1, C1, D2, F2, H).

Identical pulsotype only occurred among two rodent outbreak strains (A1) from the same place (Sit. Bacalhau/Solanea) and two non-outbreak rodent strains but from two different places (Sit Gito/Natuba and Eng. Covao/Salgado de Sao Felix) and years (G1).

Temporal distribution

Identical pulsotypes were found in different years; outbreak was not separated from non-outbreak strains by their PFGE patterns: pulsotype F1 occurred in 1980 and 1986 (P. Exu 843 and P. PB 876) in different rodent hosts and counties; and pulsotype G1 in 1980 and 1982 (P. Exu 851 and P. Exu 860) from identical host but different counties (Fig. 2).

DISCUSSION

Among the several typing molecular methods, PFGE macrorestriction analysis is showing highly valuable for grouping and differentiation on many pathogenic bacteria. Although PFGE sensitivity and discriminatory ability depend on the restriction enzyme and organism studied, its high performance became valuable for many bacteria typing and *Y. pestis* strains discrimination (Guiyoule et al. 1994, Huang et al. 2002, Revazishvili et al. 2008, Zhang et al. 2009).

Revazishvili et al. (2008) successfully separated Georgian from non Georgian strains by PFGE and Zhang et al. (2009) showed by PFGE that isolates from the same site were identical regardless of hosts or year of isolation and strains from geographical distinct places were genetically divergent.

Our study did not separate outbreak from non-outbreak strains for identical pulsotype patterns were found among outbreak strains as well as in those obtained during surveillance activities (Fig. 2). Outbreak strains were isolated within a short period (September to December 1986) and the endemic strains were isolated 10 years earlier from July 1979 to August 1982. These strains came from a small area (~145 km) located in the ecological complex Chapada da Borborema, the largest but not the most active Brazilian plague focus (Baltazard 2004).

Genetic heterogeneity was found among the 22 strains analyzed that were divided into two groups (I-II), eight subgroups (A-H) and 19 PFGE profiles or pulsotypes. Such heterogeneity was also found among U.S. strains by Huang et al. (2002) that identified 26 PFGE types among 37 strains and referred variations of two to three bands among the strains.

Most strains from the same spatial, temporal and host origin displayed different pulsotypes. Surprisingly strains from the same rodent species during the outbreak displayed different profiles for one could expected the same profile in strains closely epidemiologically related. These different *Y. pestis* populations may reflect microevolution of the invading strain due to environmental pressure experienced while spreading inland from the coast. In fact they are all descending from the strain disseminated worldwide during the third pandemic, biovar Orientalis (glycerol negative and nitrate positive) (Perry & Fetherston 1997).

On the other hand identical patterns for strains from different localities and time period ratify their common origin complying with a single introduction of *Y. pestis* in Brazil (WHO 1965, Baltazard 2004).

PFGE pattern alterations associated with serial subculturing of *Y. pestis* isolates were reported (Lucier & Brubaker 1992, Guiyoule et al. 1994). Leal-Balbino et al. (2004, 2006) and Leal et al. (2000) observed spontaneous alterations in the genome (plasmidial and chromosomal) of Brazilian *Y. pestis* through prolonged storage and manipulation in the laboratory. The stability of the PFGE profiles was investigated by the analysis of serial subcultures of three strains. Each strain exhibited a unique PFGE profile and derived cultures revealed the same parental profile.

In Brazil, since 2005, there were no laboratory-confirmed human cases and the last *Y. pestis* isolation occurred in 1997 in the Ibiapaba focus (Ceara State), however serological surveys continuously detects plague antibodies on sentinel animals on plague areas suggesting that they remain active (Leal & Almeida 1999, WHO 2006, Aragão et al. 2009, WHO 2010). Quiescent periods characterized by the absence or occurrence of rare human cases, may be misleading for plague may reappear after many apparent control decades and its spreading potential by international trade or bioterrorism must be considered (Duplantier et al. 2005, Gage & Kosoy 2005, WHO 2006, 2010). Therefore, the knowledge of local strains characteristics and the availability of effective and rapid typing methods are essential to elucidate the origin of new strains, if by natural foci emergence, reemergence, coming from other countries or bioterrorism action, as well as to allow health surveillance and effective measures control (Stenseth et al. 2008).

In conclusion, in the present work we demonstrated the usefulness of PFGE for discriminating among Brazilian *Y. pestis* isolates. The results obtained by the analysis of two sets of strains (17 from an

outbreak and 5 during endemic period) revealed intraspecific genetic diversity in the samples studied which will contribute for future in-depth epidemiological studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Serviço Nacional de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Process N° 482694/2009-2. We thank Henri Berghs Inc. of Fairport, representing the Applied Maths for technical assistance with Bionumerics Programs.

REFERENCES

- Abath FGC, Almeida AMP, Ferreira LC 1989. Electrophoretic Characterization Of The Outer Membrane Proteins Of *Yersinia pestis* Isolated In North-East Brazil. *Epidemiol. Infect* 103: 595-602.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR 1985. Isolation of *Yersinia pestis* in plague foci of Northeast Brazil from 1966 to 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 27: 207-218.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, Rego RVB, Almeida CR 1989. Bacteriological and serological studies of a plague outbreak in the Paraíba, State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84: 249-256.
- Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane, ACM, Tavares C, Almeida, AMP 2009. Prevalence of antibodies against *Yersinia pestis* in domestic carnivores, in plague foci in the State of Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med Trop* 42: 711-715.
- Baltazard M 2004. 4^e rapport (mai 1970) Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 97 (supplément): 93-117.
- Dice LR 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 379-393.
- Duplantier JM, Duchemin JB, Chanteau S, Carniel E 2005. From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Vet. Res* 36: 437-453.
- Gage KL, Kosoy MY 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol* 50: 505-528.
- Guiyole A, Grimont F, Iteman I, Grimont PAD, Lefevre M, Carniel E 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol* 32: 634-641.
- Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE 2002. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J. Clin. Microbiol* 40: 1164-1173.
- Hunter PR, Gaston MA 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol* 26: 2465-2466.
- Karimi Y 1978. Rapid laboratory diagnosis of plague. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 71: 45-48.
- Leal NC, Almeida AMP, Ferreira LCS 1989. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraíba State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 31: 295-300.
- Leal NC, Almeida AMP 1999. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41: 339-342.
- Leal NC, Sobreira M, Leal TCA, Almeida AMP 2000. Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. *Braz. J. Microbiol* 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CGV, Almeida AMP 2004. Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 727-732.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Nascimento MGM, Oliveira MBM, Balbino VQ, Almeida AMP 2006. The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genet. Mol. Biol* 99: 727 - 732.
- Lucier TS, Brubaker RR 1992. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed field electrophoresis. *J. Bacteriol* 174: 2078-2086.
- Perry RD, Fetherston JD 1997. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev* 10: 35-66.
- Revazishvili T, Rajanna C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, Imnadze P, O'Connell K, Kreger A, Stine OC, Morris JGJr, Sulakvelidze A 2008. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect* 14: 429-436.
- Rocha SS, Almeida AMP, Leal NC, Cordeiro MT, Barbosa CS, Oliveira GM, Melo FL, Silva BT, Gomes YM 2009. Biological collections from Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation: analysis of a workshop. *Rev. Pat. Trop* 38: 299-309.

- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat C, Gage KL, Leirs H, Rahalison L 2008. Plague: past, present and future. *PLoS Medicine* 5: 9-13.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* 9: 2233-2239.
- Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, Lee J, Nera R, Eppinger M, Ravel J, Rahalison L, Rasoamanana BW, Beckstrom-Sternberg SM, Achtman M, Chanteau S, Keim P 2011. Phylogeography and Molecular Epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Plos Negl. Trop. Dis* 5: e1319.
- WHO 1965. Plague in the Americas. *World Health Organization Scientific Publications* 115: 44-68.
- WHO 2006. International meeting on prevention and controlling plague: the old calamity still has a future. *World Health Organization Scientific Publications* 80: 278-284.
- WHO 2010. Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004-2009. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 40-45.
- Zhang Z, Hai R, Song Z, Xia L, Liang Y, Cai H, Liang Y, Shen X, Zhang E, Xu J, Yu D, Yu XJ 2009. Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan Province of China. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81: 714-717.

TABLE IHost source and spatial and temporal distribution of the *Yersinia pestis* strains studied.

Year	Locality		Source					Total
	Municipality	Sítio/Farm	Man	Rodents Rr ^a	Nl ^b	Os ^c	Hs ^d	
1986	Solanea	Bacalhau	-	01	-	02	-	03
		Cinco Lagoas	-	02	01	-	-	03
		Pedra d'Água	01	01	02	01	01	06
		Lagoa do Serrote	-	-	01	-	-	01
		Cinco Estrelas	-	-	01	-	-	01
		Sete Lagoas	-	-	-	01	-	01
		Valerio	-	01	-	-	-	01
	Remigio	Serrinha	01	-	-	-	-	01
1979/1982	Natuba	Estivas	-	-	-	01	-	01
		Taua	-	-	01	-	-	01
		Salgadinho	-	-	01	-	-	01
		Gito	-	-	01	-	-	01
	Salgado Sao Felix	Engenho Covao	-	-	01	-	-	01
Total			02	05	09	05	01	22

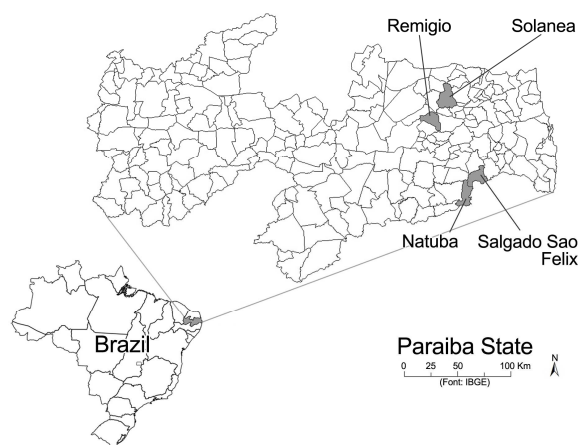
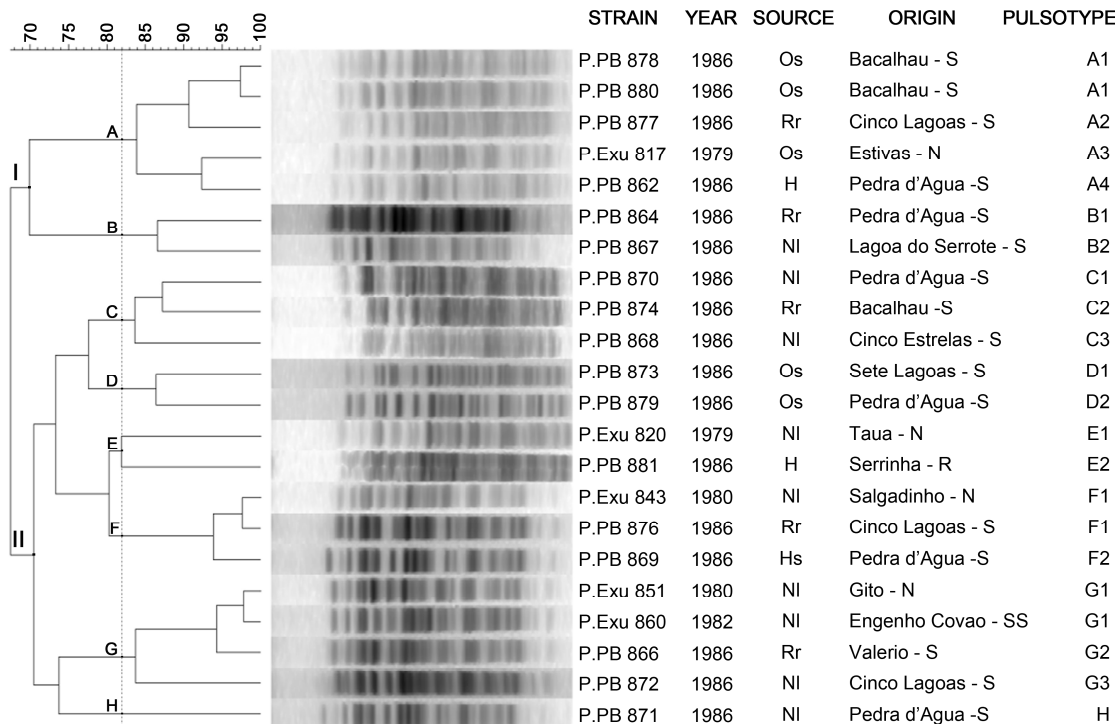
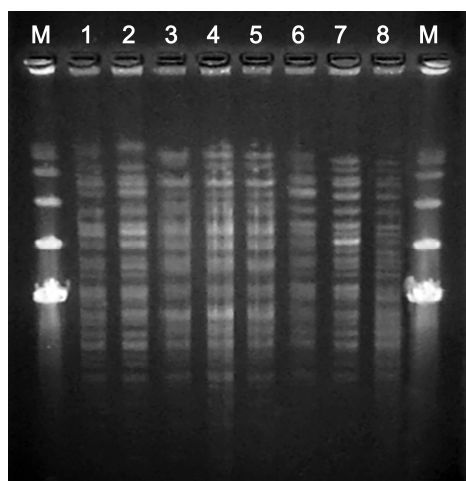
a - Rr: *Rattus rattus*; b - Nl: *Necromys lasiurus*; c - Os: *Oryzomys subflavus*; d - Hs: *Holochilus sciureus*.

Fig. 1: Map of Brazil and Paraíba State showing the Counties from the *Yersinia pestis* strains originated.

Dice (Opt 0.10%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Typing PFGE

**Fig. 2:** Dendrogram generated by BioNumerics software from PFGE cuts by *AscI* on 22 Brazilian *Yersinia pestis* strains. N: Natuba; R: Remigio; S: Solanea; SS: Salgado de Sao Felix municipalities. Os: *Oryzomys subflavus*; NI: *Necromys lasiurus*; Rr: *Rattus rattus* rodent species; Hs: *Holochilus sciureus*; H: Humans.**Fig. 3:** Stability of the PFGE profiles of subcultures of the *Y. pestis* strains. Lane M: DNA Ladder PFGE (Kb); lane 1: P. Exu 340 1R; lane 2: P. Exu 340 10R; lane 3: P. Peru 375 1R; lane 4: P. Peru 375 4R; lane 5: P. Peru 375 32R; lane 6: P. CE 882 1R; lane 7: P. CE 882 22R; Lane 8: P. CE 882 32R.

10. Memorial

Vladimir da Mota Silveira Filho,

possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2004), além de mestrado (2007) em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco. Desde 2007, é doutorando em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco, onde foi premiado na I Jornada de Pós-Graduação em Genética (UFPE), pela apresentação oral do seu trabalho de conclusão. Tem experiência didática na área, com ênfase em Genética Básica, Evolução, Citogenética e Biologia Molecular do Desenvolvimento, devido ao período que lecionou como professor substituto na Universidade Federal da Paraíba. Desenvolve pesquisas na área de Genética de Microrganismos, atuando principalmente nos seguintes temas: doenças bacterianas, epidemiologia molecular, filogenética e análise genômica, transcricional e proteômica. Através de treinamentos e capacitações, encontra-se familiarizado com temas relacionados à biossegurança e biosseguridade, possuindo experiência no desenvolvimento de trabalhos em biotérios e laboratórios com nível 3 de biossegurança. Ao longo da carreira acadêmica, publicou 06 artigos na área de Biologia Molecular de Microrganismos, 02 capítulos de livros na área de Biossegurança e 38 resumos de trabalho em eventos nacionais e internacionais, além de participar da banca de 07 trabalhos de conclusão de curso de graduação.