

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Caracterização estrutural dos locos CRISPR em cepas brasileiras de
*Yersinia pestis***

Aluna: Camila Tenorio França

Orientadora: Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-Orientadora: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Recife, PE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterização estrutural dos locos CRISPR em cepas brasileiras de
*Yersinia pestis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-orientadora: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Recife, PE

2012

França, Camila Tenorio

Caracterização estrutural dos locos CRISPR em cepas brasileiras de *Yersinia pestis*/
Camila Tenorio França. – Recife: O Autor, 2012.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Yersinia pestis* 2. Genética bacteriana 3. Peste I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (orientadora) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorientadora) III. Título.**

579.34 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-184

Camila Tenorio França

Caracterização estrutural dos locos CRISPR em cepas brasileiras de *Yersinia pestis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 08/08/2012

BANCA EXAMINADORA

Dra Alzira Maria Paiva de Almeida - Orientadora
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra Maria Betânia Melo de Oliveira - Co-orientadora
Universidade Federal de Pernambuco

Dra Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra Nilma Cintra Leal
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr Ranilson Bezerra de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Dra Carina Lucena Mendes Marques
Centro de Pesquisas Aggeu magalhães

RESUMO

Yersinia pestis é o agente causador da peste, doença primária de roedores transmitida por pulgas, que pode afetar o homem e outros mamíferos. A subtipagem molecular das cepas de *Y. pestis* tem sido dificultada pela grande similaridade genética entre os isolados. A análise dos locos CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) trouxe avanços em estudos filogenéticos e tipagem de cepas de *Y. pestis* dos numerosos focos dos diversos países. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade intraespecífica em cepas brasileiras de *Y. pestis* através do estudo dos locos CRISPR. As três sequências CRISPR (YPa, YPb e YPc) reconhecidas da *Y. pestis* foram amplificadas nas 98 cepas analisadas, originadas de diferentes fontes, focos e momentos epidemiológicos. Os amplicons obtidos por PCR foram analisados em gel de agarose e sequenciados. O loco YPa se mostrou o mais polimórfico, apresentando seis alelos de 449 a 630 pares de base (pb), seguido pelo YPb, com quatro alelos de 271 a 392 pb. O loco YPc, monomórfico, apresentou apenas um alelo de 331 pb em toda as cepas. Foi observado que as repetições diretas (DRA) são compostas de 28 pb, separadas por sequências espaçadoras únicas de 32 ou 33 pb em todos os locos. Dos 137 espaçadores já conhecidos 18 foram encontrados nas cepas analisadas e, adicionalmente, 19 novos espaçadores foram observados, 15 no loco YPa e quatro no loco YPb. A análise da distribuição dos espaçadores definiu 20 perfis genotípicos, refletindo a diversidade intraespecífica das cepas brasileiras, e evidenciou uma correlação entre a presença de alguns conjuntos de sequências espaçadoras e os focos de origem das cepas. A maioria dos perfis é exclusiva de uma cepa de um foco, e alguns são dispersos em vários focos e períodos. As incorporações/perdas de motivos observadas nos locos YPa e YPb sugerem que estes estão ativos e a ausência de alterações no loco YPc sugere inatividade. Em conclusão, a análise dos locos CRISPR revelou heterogeneidade e identificou características genéticas exclusivas nas cepas brasileiras que podem ser atribuídas à microevolução da bactéria após sua introdução no país.

Palavras Chave: sequências espaçadoras, diversidade intraespecífica, microevolução, focos de peste.

ABSTRACT

Yersinia pestis is the causative agent of plague, a disease of rodents transmitted by fleas, which can affect humans and other mammals. Molecular subtyping of *Yersinia pestis* strains has been difficult due to the great similarity among the isolates. Analysis of CRISPR *loci* (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) allowed further advances in *Y. pestis* phylogenetic and typing of strains from different countries. The aim of our study was to assess intraspecific diversity in *Y. pestis* Brazilian strains through the study of CRISPR *loci*. In this study the three recognized *Y. pestis* CRISPR *loci* (YPa, YPb and YPc) were amplified in the 98 strains isolated from different sources, geographic area and epidemiological events. The PCR-generated amplicons were analysed on agarose gels and sequenced. The YPa *locus* revealed the most polymorphic, with six alleles ranging from 449 to 630 base pair (bp), followed by YPb, with four alleles from 271-392 bp. The YPc *locus* was monomorphic with 331 bp allele in all strains. The direct repeats (DRA) presented 28 bp separated by a 32 or 33 bp spacer in all three *loci*. Among the 137 known spacers 18 were found in the analyzed strains and 19 new spacers were observed: 15 in the YPa *locus*, and four in the YPb *locus*. The analysis of spacers, number and distribution, defined 20 genotypes and allowed a correlation between some sets of spacers and the strains' *foci*. Most of the genotypes are unique from a single strain and *focus*, while others are found in several *foci* and periods. The spacers addition or loss in the YPa and YPb *loci* suggest that they are active and no change was found in the YPc suggesting inactivity. In conclusion, the analysis of CRISPR *loci* revealed intraspecific diversity and identified unique genetic characteristics of Brazilian strains, showing species' microevolution after introduction in Brazil.

Key words: spacers, intraspecific diversity, microevolution, plague *foci*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE e ao Serviço Nacional de Referência em Peste.

Às minhas orientadoras, Dra Alzira Almeida e Dra Maria Betânia, dois enormes exemplos de profissionais e mulheres, por toda paciência e ensinamentos, que me fizeram querer melhorar a cada etapa.

A Milena, por toda sua ajuda na bancada e a Paloma, que além da bancada me ajudou com todas as minhas dúvidas, as quais sempre sanou com muita eficiência e prontidão! Novamente a Paloma e Milena, mas também a Carina, Vladimir e Felipe, pelos longos e divertidos almoços, além das intensas ‘rodas científicas’ que me fizeram aprender muito!

A Dra Tereza Cristina Leal Balbino e todos do Departamento de Microbiologia - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, por me receberem e serem sempre bastante prestativos durante toda realização dos meus experimentos.

A Dra Nilma Cintra Leal, por todas as suas contribuições, além de sua grande simpatia!

A coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, Profa. Dra Tereza Correia, pelo empenho na condução do curso, e a Adenilda Eugênia por todo auxílio e disponibilidade.

Ao corpo docente da Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFPE e a todos os colegas de turma Mestrado (2011).

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

De todo coração, ao meu marido Filipe, minha maravilhosa Beatriz, meus pais, Adeval e Guiomar, e minha irmã Carina, que mesmo sem entender nada do que eu faço entenderam que era importante para mim, e assim me apoiaram, ajudaram, obrigaram, parabenizaram, brigaram e tudo mais que só a família faz!!

E a todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, obrigada!

LISTA DE FIGURAS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
Figura 1: Focos naturais de peste no Brasil.	13
Figura 2: Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009.	14
Figura 3: Ciclo epidemiológico da peste.	15
Figura 4: Principais formas clínicas da peste.	17
Figura 5: <i>Yersinia pestis</i> em tecido sanguíneo.	20
Figura 6: Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Yersinia pestis</i> .	21
Figura 7: Esquema representativo dos locos CRISPR.	23
Figura 8: Esquema do mecanismo de defesa baseado no complexo CRISPR/Cas.	24
Figura 9: Modelo geral de prevenção auto imune do complexo CRISPR/Cas.	25
Figura 10: Figura esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no cromossomo de cepas de <i>Yersinia pestis</i> sequenciadas.	25

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO

	Página
Figura 1: Variabilidade estrutural dos locos CRISPR nas cepas de <i>Yersinia pestis</i> analisadas.	53
Figura 2: Distribuição geográfica dos perfis genotípicos identificados nas cepas de <i>Yersinia pestis</i> analisadas.	53

LISTA DE TABELAS – ARTIGO

	Página
Tabela I: Características gerais das cepas de <i>Yersinia pestis</i> estudadas.	50
Tabela II: Novos espaçadores identificados nas cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	- Microlitro
mM	- Milimol
ng	- Nanograma
pH	- Potencial de Hidrogênio
pmol	- Picomol
rpm	- Rotações por minuto
U	- Unidade

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 A peste na história	12
2.2 Realidade atual	14
2.3 O ciclo epidemiológico da peste	15
2.4 A doença	16
2.5 Diagnóstico e tratamento	18
2.6 Prevenção e controle	19
2.7 <i>Yersinia pestis</i>	19
2.8 Características do genoma	20
2.9 Os locos CRISPR	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ARTIGO	31
3. CONCLUSÃO	54
ANEXO I - Normas da revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”	55
ANEXO II - Publicação	61

1. INTRODUÇÃO

A *Yersinia pestis* é o agente etiológico da peste, doença infecciosa responsável pela morte de milhões de indivíduos em diferentes épocas. A peste ainda constitui ameaça devido à persistência em numerosos focos naturais, reemergência em alguns países, possibilidade de rápido deslocamento dos infectados, além do risco de utilização do bacilo como arma biológica em ataques bioterroristas. Diante disso, a caracterização genética das cepas de *Y. pestis* e a disponibilidade de métodos rápidos de tipagem são essenciais para identificação da origem de novas cepas, rastreamento e origem de surtos, ações de bioterrorismo, além de contribuir para vigilância efetiva dos focos e compreensão da evolução da bactéria na natureza.

No início da década de 1960 o governo brasileiro, com apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), organizou o projeto “Plano Piloto de Peste em Exu” que foi executado de 1966 a 1974, visando à elucidação dos fatores responsáveis pela conservação, focalização, epizootização e epidemização da peste no Brasil, com vistas à implementação de atividades eficazes de controle. Ao final do projeto mais de 600 cepas de *Y. pestis* haviam sido isoladas, e trabalhos posteriores aumentaram o acervo para 917 cepas, atualmente depositadas na coleção Fiocruz - CYP.

A análise dos locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) vem sendo utilizada com sucesso para tipagem e estudos filogenéticos em diferentes gêneros bacterianos. O conteúdo e a variabilidade dessas regiões, mesmo em cepas intimamente relacionadas, provêm uma base genética para tipagem. Em *Y. pestis*, sua localização cromossômica e a estabilidade genética favorecem o estudo dessas regiões.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética das cepas brasileiras através da análise das sequências CRISPR, visando contribuir para a compreensão da microevolução desta bactéria na natureza desde sua introdução no país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A peste na história

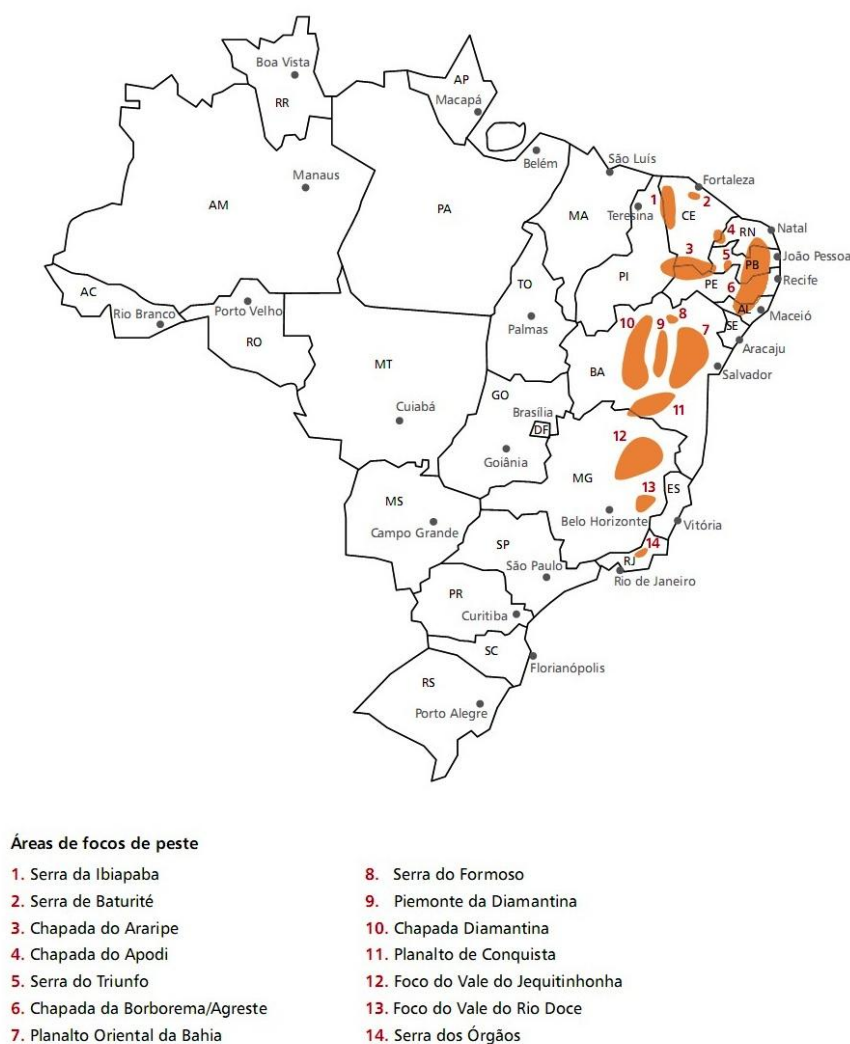
A peste originou-se, provavelmente, no Planalto Central Asiático e durante a Era Cristã causou três pandemias devastadoras: a primeira, a “Peste de Justiniano”, afligiu o norte da África, a Europa e o Centro-Sul Asiático entre os anos 542 a 602 d.C., causando elevada mortalidade e considera-se que contribuiu para o declínio do Império Bizantino. A segunda, a famigerada “Peste Negra”, estendeu-se do século XIV ao XVI e, predominantemente sob a forma pneumônica, levou a óbito um terço da população europeia apenas entre os anos 1347 a 1353, além de outros 20 milhões de indivíduos até o final do século XVI. A terceira, a “Pandemia Contemporânea” ou “Oceânica”, teve início na China em 1855 e é considerada a verdadeira pandemia, pois graças ao desenvolvimento do transporte marítimo, que passou do uso de navios à vela para os navios a vapor, em menos de 50 anos atingiu locais do mundo até então idenes (PERRY; FETHERSTON, 1997).

O desenvolvimento de medidas eficazes de saúde pública - graças aos conhecimentos científicos adquiridos sobre a bactéria, seus hospedeiros e vetores - o estabelecimento da antibioticoterapia e o uso de inseticidas e rodenticidas eficientes possibilitaram que o número de vítimas desta pandemia fosse significativamente menor que nas anteriores. Segundo Mollaret (1989), seu processo de expansão diminuiu grandemente após a Segunda Guerra Mundial, quando as antigas embarcações infestadas de roedores e pulgas foram afundadas e substituídas pelos modernos navios à prova de ratos.

Foi durante a terceira pandemia que, em 1894, o pesquisador Alexander Yersin identificou o microrganismo causador da peste em cadáveres humanos e em ratos (*Rattus rattus*). Independentemente, na mesma época, o pesquisador Kitasato Shibasaburō também identificou a bactéria, que ficou conhecida como “o bacilo de Kitasato/Yersin”, no entanto, a descrição e as conclusões de Yersin foram mais acuradas. Por algum tempo, a bactéria foi denominada *Pasteurella pestis*, mas em 1974 com a oficialização do gênero *Yersinia*, passou a ser denominada *Yersinia pestis*. Yersin também estabeleceu a relação entre os ratos e a peste, e em 1896 desenvolveu, com auxílio de Henri Carré e Waldemar Haffkine, o primeiro anti-soro contra a doença, que teve sua eficácia demonstrada em 1897 por Haffkine durante um surto de peste em Bombay, Índia. Nesta mesma época, os pesquisadores Paul Louis Simond e Masanori Ogata independentemente descreveram o papel das pulgas na transmissão da doença (DRANCOURT; RAOULT, 2002; LINGON, 2006).

A peste chegou ao Brasil pelo porto de Santos-SP em outubro de 1899, durante a expansão da terceira pandemia (WHO, 1965). Inicialmente a infecção dispersou-se pelas cidades litorâneas (fase portuária), e a partir de 1907 através de ferrovias e rodovias chegou ao interior do país atingindo cidades, vilas e povoados (fase urbana). Campanhas profiláticas promovidas pelo Governo Federal, que incluíam a eliminação de roedores e pulgas, além do tratamento e isolamento dos doentes, e o crescente progresso possibilitaram sua eliminação das áreas portuárias e urbanas, mas não impediram, no entanto, que chegasse a fazendas e sítios (fase rural), onde se instalou entre os roedores silvestres estabelecendo diversos focos naturais em vários complexos ecológicos localizados desde o Ceará até o norte de Minas Gerais (os chamados focos do nordeste) e na Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro (figura 1) (TAVARES et al. 2012; WHO, 1965).

Figura 1: Focos naturais de peste no Brasil.

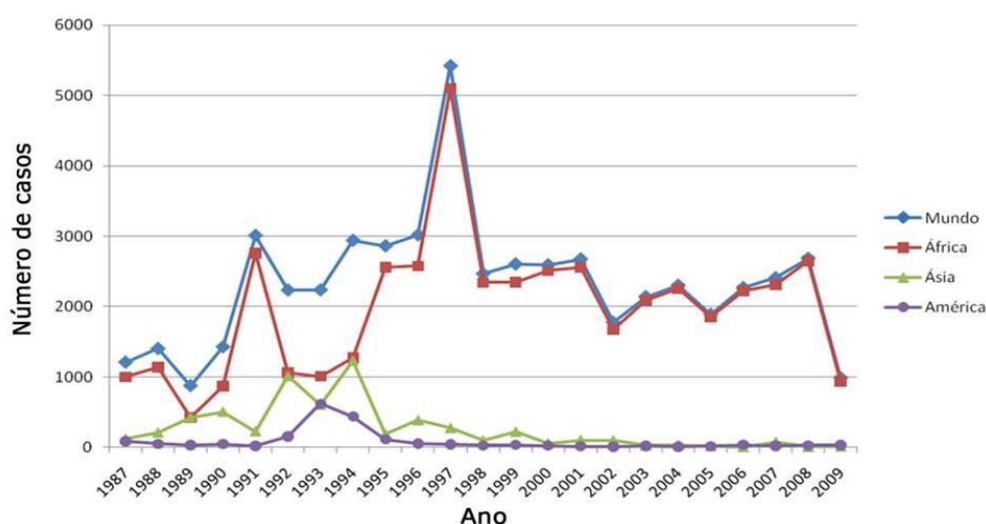


Fonte: BRASIL, 2008.

2.2 Realidade atual

De 1987 a 2009, cerca de 44.000 casos humanos foram registrados em 26 países, principalmente na África (República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia), Ásia (China, Vietnã, Mongólia e Cazaquistão), e Américas (EUA, Peru, Equador e Bolívia) (figura 2). Os números notificados, no entanto, podem ser considerados subestimativas da situação real, principalmente devido à falta de vigilância adequada em alguns países e do temor do impacto que uma notificação teria sobre a economia nacional (STENSETH et al. 2008; WHO, 2010).

Figura 2. Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009.



Fonte: WHO, 2010.

Nos focos de peste do Brasil, pequenos surtos ocorriam até meados da década de 1980, principalmente nos estados de Pernambuco, Paraíba, Ceará e Bahia. A partir dos anos 1990 todos os focos tenderam a quiescência, com excessão dos focos da Bahia, onde foram notificados 206 casos no período de 1987 a 2000 (SAAVEDRA; DIAS, 2011). Nos demais focos, a ocorrência de casos é rara - os últimos em 1997 e 2005 no Ceará (TAVARES et al. 2012). No entanto, apesar da ausência de casos humanos, as atividades de vigilância sorológica nas áreas focais têm detectado a presença de anticorpos contra a peste em cães (animais sentinelas), o que sugere circulação permanente da bactéria na natureza e que aqueles focos permanecem ativos (ARAGÃO et al. 2009; SRP, 2012 – Comunicação pessoal).

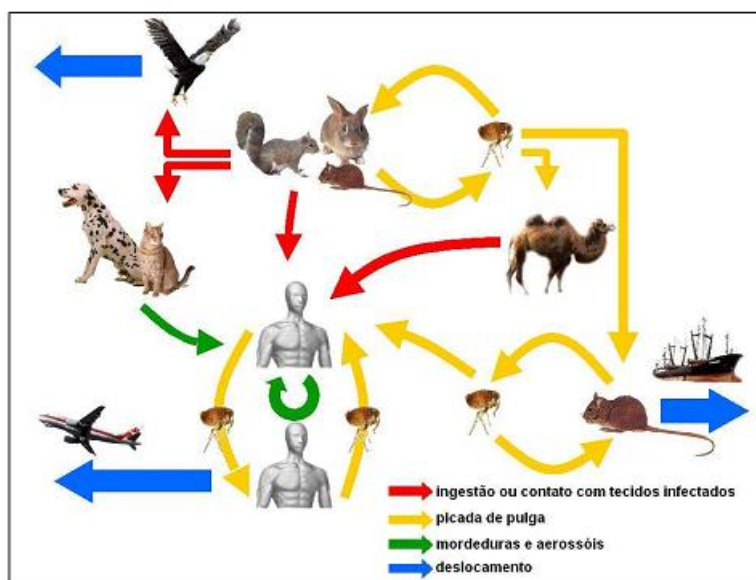
A ocorrência, em muitos países, de períodos de silêncio caracterizados pela ausência ou a

ocorrência de raros casos em humanos é comum e pode parecer indício da erradicação da doença. Entretanto, a peste tende a reaparecer após décadas de aparente controle e seu potencial de se disseminar internacionalmente deve ser sempre considerado (DUPLANTIER et al. 2005; GAGE; KOSOY, 2005; WHO 2006, 2010).

2.3 O ciclo epidemiológico da peste

A peste é uma zoonose primordialmente de roedores, transmitida através da picada de pulgas infectadas. O homem e outros mamíferos (cães, gatos, coelhos, caprinos e camelos) também são susceptíveis a doença e podem ser infectados, além de picada da pulga, através de mordedura, inalação de aerossóis, ingestão ou contato com tecidos infectados. A ocorrência de casos humanos, no entanto, é considerada acidental e deve-se principalmente às suas incursões ao ecossistema dos roedores durante atividades de caça, agricultura e lazer, ou pela introdução de roedores e pulgas infectados ao habitat humano. Eventualmente a transmissão inter-humana também pode ocorrer (figura 3) (PERRY; FETHERSTON, 1997).

Figura 3: Ciclo epidemiológico da peste.



Fonte: LEAL-BALBINO et al. 2009.

O ciclo epidemiológico da peste é complexo e pode ser desdobrado em quatro ciclos bioecológicos: o ciclo enzoótico ocorre entre os hospedeiros naturais, roedores moderadamente

resistentes. O ciclo epizoótico (ou silvestre) inclui a transmissão do bacilo entre roedores sensíveis, que ao morrerem liberam suas pulgas infectadas que buscam e infectam outros hospedeiros. O ciclo domiciliar (ou urbano) resulta do intercâmbio entre animais domésticos e humanos com roedores silvestres infectados e/ou suas pulgas. Já a transmissão pessoa a pessoa dá origem ao ciclo pneumônico da doença, o qual pode resultar em grandes epidemias humanas (peste dêmica) (BRASIL, 2008).

Nos focos do nordeste do Brasil, os principais roedores envolvidos no ciclo epidemiológico da peste pertencem aos gêneros: *Necromys* (anteriormente *Zygodontomys*, *Bolomys*), *Rattus*, *Cerradomys* (anteriormente *Oryzomys*), *Galea*, *Thrychomys*, *Oligoryzomys* (anteriormente *Oryzomys*), *Calomys*. A espécie *Necromys lasiurus* pode desempenhar importante papel na disseminação da peste devido a sua alta suscetibilidade à *Y. pestis* e alta capacidade reprodutiva, podendo atingir grande densidade populacional e hospedar pulgas com capacidade transmissora (BALTAZARD, 1968; TAVARES et al. 2012).

As pulgas participam do ciclo como vetores-reservatórios do bacilo da peste. Das 1.200 espécies de pulgas conhecidas, 55 são encontradas no Brasil. Nos focos do Nordeste do país os principais transmissores da peste são *Polygenis bohlsi jordani* e *Polygenis tripus*, parasitas dos roedores silvestres, *Xenopsylla cheopis* (pulga do rato) e *Pulex irritans* (pulga do homem) (TAVARES et al. 2012). As aves são refratárias à infecção pela *Y. pestis*, mas podem desempenhar um papel importante na disseminação da doença através do transporte de pulgas ou carcaças de animais infectados (STENSETH et al. 2008).

2.4 A doença

Clinicamente, a peste humana apresenta três formas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica (figura 4):

A peste bubônica é a forma mais comum (98% dos casos) transmitida pelas picadas das pulgas, com um período de incubação de dois a seis dias. O doente apresenta febre alta, calafrios, cefaléia, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos e dores generalizadas, e como principal característica o bubão (tumefação do linfonodo) próximo ao local onde ocorreu a picada da pulga (BRASIL, 2008).

A peste septicêmica (caracterizada pela multiplicação do bacilo no sangue) pode desenvolver-se devido à contaminação direta com culturas, secreções, sangue e tecidos de animais infectados através de abrasões da pele ou conjuntiva ocular, ou secundariamente às outras formas clínicas não corretamente tratadas. Os sintomas são semelhantes aos de outras infecções sistêmicas como febre alta, dor de cabeça, mal estar, calafrios e distúrbios gastrointestinais. A bacteremia pode resultar em necrose devido ao acúmulo do bacilo e suas toxinas nas extremidades dos membros, sendo letal em 30 a 50% dos casos não tratados corretamente (BRASIL, 2008).

A peste pneumônica ocorre pela introdução do bacilo através da mucosa respiratória (peste pneumônica primária), ou secundariamente às formas bubônica ou septicêmica não tratadas. Após um curto período de incubação (dois a três dias) tem-se o desenvolvimento abrupto de sintomas como febre alta, calafrios, arritmias, hipotensão, náuseas, vômitos, astenia e confusão mental. Inicialmente os sintomas pulmonares são discretos ou ausentes, com posterior surgimento de dores no tórax, respiração curta e rápida, e expectoração sanguinolenta rica em bacilos pestosos. Trata-se da forma mais grave da doença por seu desenvolvimento rápido, alta letalidade, potencial de contágio elevado e capacidade de provocar epidemias pela transmissão pessoa-a-pessoa. Em qualquer das três formas, a doença é fatal sem tratamento rápido e intenso após o aparecimento dos sintomas (BRASIL, 2008).

Figura 4: Principais formas clínicas da peste: **A.** Bubônica: seta indica bubão axilar; **B.** Septicêmica: necrose nas extremidades dos membros; **C.** Pulmonar: pulmão retirado de uma vítima de peste pneumônica.



Fontes: A e B - <http://www.cdc.gov>; C- SMITH; REISNER, 1997.

Outras formas mais raras são a meningea, cutânea primária, faríngea e endoftálmica. Em oposição às formas graves, há um quadro clínico oligossintomático denominado peste benigna ou *pestis minor*, caracterizado clinicamente por manifestações gerais leves como adenopatia discreta, febre baixa e cura espontânea (BRASIL, 2008).

2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico laboratorial da peste é realizado através de testes específicos que visam o isolamento e a identificação da bactéria; a detecção da presença de anticorpos específicos contra a *Y. pestis* no soro; ou a identificação de genes de virulência característicos da *Y. pestis* através de técnicas moleculares (BRASIL, 2008).

O tratamento da doença deve ser precoce e intensivo devido à gravidade e a rapidez da evolução da doença, visando deter a bacteremia e superar a toxemia. Durante as primeiras 48 horas do tratamento recomenda-se o isolamento do paciente a fim de minimizar o risco de contaminação dos contatos nos casos de pneumonia (BRASIL, 2008).

Y. pestis é sensível à maioria dos antimicrobianos, com exceção da penicilina e seus derivados (cefalosporinas, cefamicinas, oxicefamicinas, carbapanemas e monobactâmicos), macrolídeos (eritromicina, claritromicina, roxitromicina e miocamicina) e azalídeos (azitromicina). Os antimicrobianos de escolha para o tratamento da doença são gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Na década de 1990 duas cepas multiresistentes foram isoladas de pacientes em Madagascar (GALIMAND et al. 1997; GUIYOULE, 2001), e há registro da existência de cepas resistentes às quinolonas na Rússia (INGLESBY et al. 2000).

As primeiras vacinas desenvolvidas contra a peste eram produzidas com culturas de cepa total: a USP ou *Killed Whole-Cell* (KWC) utilizava a cepa virulenta 195/P inativada pela formalina (*formol killed vaccin*); outra, utilizava a cepa EV-76 avirulenta pela perda do fenótipo pigmentação ou deleção do loco Pgm. Apesar de proteger contra a forma bubônica da doença, estas vacinas são pouco eficazes contra a forma pneumônica, além de produzirem sérios efeitos colaterais, e o seu uso foi interrompido nos EUA desde 1999 (KENNETH; CURTISS III, 2011).

Novas vacinas, recombinantes, com anticorpos contra antígenos específicos da *Y. pestis* (F1V ou rF1V, e rV10), se encontram em fase clínica de teste (KENNETH; CURTISS III, 2011). Derbise et al. (2012) desenvolveram uma vacina oral (V674pF1) com uma cepa de *Y. pseudotuberculosis* atenuada pela deleção da ilha de alta patogenicidade (HPI) e de dois genes (*psaA* - codifica antígeno do pilus e *yopK* - codifica a proteína efetora YopK do sistema de secreção do tipo III) capaz de produzir o antígeno capsular F1, pela introdução do operon *caf*. Em testes com animais a V674pF1 confere alta proteção contra a peste pneumônica.

2.6 Prevenção e controle

No Brasil, a vigilância da peste é realizada pelos municípios nas áreas pestosas, sob a orientação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e baseia-se em inquéritos sorológicos (busca por anticorpos antipestosos) em animais sentinela (cães domésticos) das áreas de foco e, eventualmente, análises bacteriológicas para pesquisa da *Y. pestis* em vísceras de roedores e em pulgas (BRASIL, 2008). Por exigência do Regulamento Sanitário Internacional (RSI), a vigilância também deve ser mantida nos portos e aeroportos internacionais (WHO, 2008).

O controle dos casos de peste nas áreas de focos é realizado através de medidas que evitem o acesso de roedores e suas pulgas aos locais frequentados pelas pessoas. Indica-se a utilização de inseticidas para eliminação das pulgas, e medidas de anti-ratização como destruição de possíveis abrigos e alimentos dos roedores (BRASIL, 2008).

Os conhecimentos científicos e tecnológicos ainda não são suficientes para erradicar a peste, uma vez que seu agente etiológico permanece firmemente arraigado nos focos naturais e em seus hospedeiros roedores, o que determina a importância da manutenção de uma vigilância constante e ativa. É de suma importância a orientação das comunidades quanto à gravidade da doença, seus aspectos epidemiológicos, econômico-sociais e de sua prevenção, induzindo-as a agir com seus próprios meios na adoção de atitudes conducentes à saúde (SAAVEDRA; DIAS, 2011).

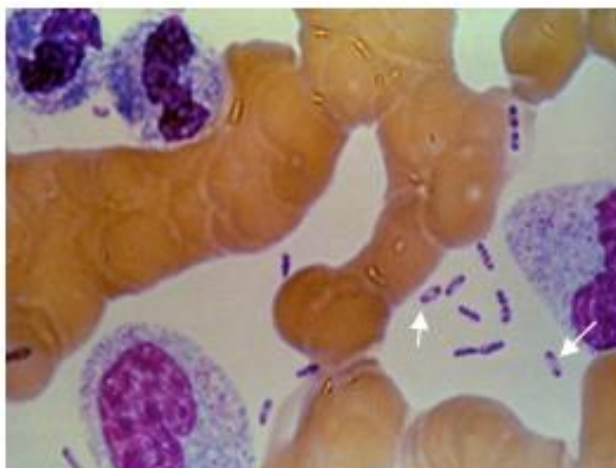
2.7 *Yersinia pestis*

Em microscopia ótica, a *Y. pestis* apresenta a forma de bacilos curtos e ovóides (0,5-0,8 µm de diâmetro x 1-3 µm de comprimento) mais claros no centro com as extremidades escuras (coloração bipolar), isolados, em pequenas cadeias ou em aglomerados (figura 5), mas a bactéria possui importante pleomorfismo podendo se apresentar em forma de anel, cocoide, bacilos longos espessos ou afilados (BRASIL, 2008).

A bactéria é aeróbia ou anaeróbia facultativa, imóvel a 28°C e a 37°C, não forma esporos e cresce em meios comuns (*brain heart infusion* - BHI, *blood agar base* - BAB e *luria-bertani* - LB), com temperatura ótima de crescimento de 28°C e pH entre 7,4 e 7,6. A bactéria não sobrevive bem saprofiticamente, sendo destruída rapidamente pela luz solar ou temperaturas acima de 40°C, no

entanto, pode permanecer viável em materiais como escarros, fezes de pulgas e tecidos protegidos (como a medula óssea) principalmente quando em baixas temperaturas (BRASIL, 2008).

Figura 5: *Yersinia pestis* em tecido sanguíneo, corada pelo método de coloração diferencial de Wayson. As setas apontam os bacilos.



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

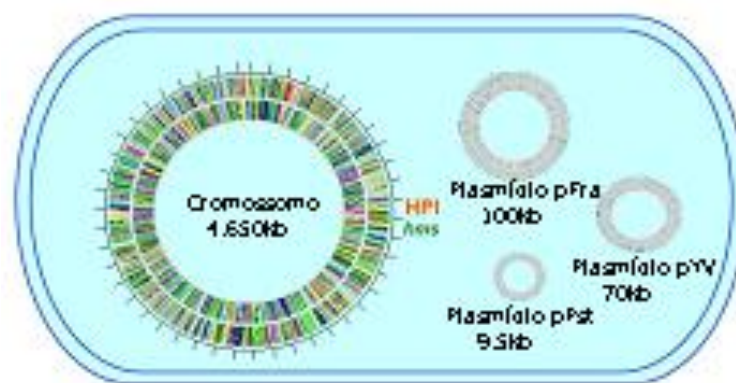
O gênero *Yersinia* (composto por 17 espécies) inclui além da *Y. pestis*, agente causador da peste, os enteropatógenos *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, e outras espécies não patogênicas (ambientais): *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* e *Y. pekkanenii*. A espécie *Y. kristensenii* pode causar doença (enteropatógeno) principalmente em imunodeprimidos. A *Y. ruckeri* é um patógeno de peixes, e sua inclusão no gênero *Yersinia* ainda é controversa (MERHEJ et al. 2008; MURROS-KONTIAINEN et al. 2010a, 2010b; PERRY; FETHERSTON 1997; SPRAGUE et al. 2008; SULAKVELIDZE, 2000).

2.8 Características do genoma

O genoma da *Y. pestis* (figura 6) é composto por um cromossomo de aproximadamente 4.650 kilobases (kb) e três plasmídios prototípicos: pPst ou pCP1 (9.5 Kb), pFra/Tox ou pMT1 (100 Kb) e pYV ou pCD1 (70 Kb) (PERRY; FERTHERSTON, 1997). Cepas atípicas, sem a presença do pPst foram encontradas em focos de peste da região do Cáucaso (entre Europa e Ásia)

(FILIPPOV et al. 1990); e contendo um pequeno plasmídio críptico adicional, PYC, de 5,9 Kb em focos da China (DONG; LINDLER; CHU, 2000). Nas cepas do nordeste do Brasil Leal et al. (2000) encontraram DNA plasmidial extra e cepas curadas de algum plasmídio. A presença de plasmídios de resistência a antibióticos foi encontrada em duas cepas isoladas de pacientes em Madagascar (GUIYOULE et al. 2001).

Figura 6: Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Yersinia pestis*.



Fonte: Cedido por Leal-Balbino, T.C.

No cromossomo, há uma região de 102 kb, o loco Pgm, dividida em dois segmentos física e funcionalmente distintos: (1) segmento de captação de ferro, uma ilha de alta patogenicidade (HPI) que permite a bactéria captar o ferro através de um sideróforo específico (Yersiniabactina); (2) segmento de pigmentação (*hms*), responsável pelo fenótipo de pigmentação (Pgm+) das colônias em meios de cultura contendo hemina ou homólogos como o pigmento vermelho Congo e relacionado à transmissão da *Y. pestis* pelas pulgas (CARNIEL, 2001; HINNEBUSCH; PERRY; SCHWAN, 1996).

O plasmídio pYV ou pCD1 existe nas três espécies de *Yersinia* patogênicas e é indispensável para a virulência das cepas. Esse plasmídio possui vários operons que codificam um sistema de secreção do tipo III (TTSS), um conjunto de proteínas efetoras, as Yops (*Yersinia outer proteins*) - responsáveis pela sobrevivência e multiplicação bacteriana nos macrófagos - e uma região dependente de cálcio, *lcr* (*low calcium response*) reguladora das Yops e que contém o gene que codifica o antígeno V (CORNELIS, 2000).

O plasmídio pPst, ou pCP1, é específico da *Y. pestis*, e contém os genes da pesticina (*pst*), da proteína de imunidade à pesticina (*pim*) e o ativador do plasminogênio (*pla*). Este plasmídio é

importante para disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro a partir do sítio da picada da pulga (HINNEBUSCH et al. 2003; PERRY; FETHERSTON, 1997).

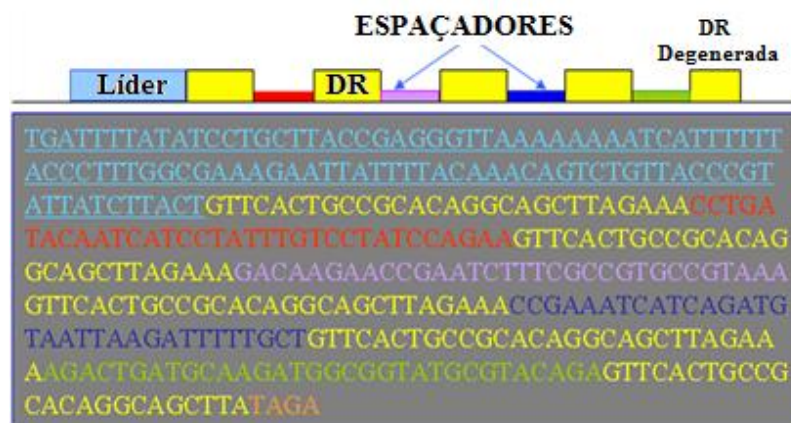
O plasmídio pFra/tox ou pYMT codifica uma fosfolipase D (toxina murina ou YMT), envolvida no processo de colonização das pulgas, e possui um operon que codifica as unidades estruturais da proteína capsular F1 e as proteínas responsáveis pela montagem e regulação da F1. A F1 é uma glicoproteína com atividade antifagocítica e altamente imunogênica para os mamíferos, sendo, por isso, a maioria dos testes de diagnóstico baseados na detecção de anticorpos anti-F1, do antígeno F1 ou do gene estrutural das sub-unidades da F1, o *caf1* (ANISIMOV; LINDLER; PIER 2004; DU et al. 2002; HINNEBUSCH et al. 2002).

2.9 Os locos CRISPR

Presentes em diferentes números de cópias no cromossomo e plasmídios nas archeas e bactérias, os locos CRISPR são uma classe de sequências repetitivas separadas por regiões espaçadoras geralmente adquiridas de elementos genéticos exógenos. Os locos CRISPR foram identificados como um arranjo de DNA repetitivo primeiramente em *Escherichia coli* K12 (ISHINO et al. 1987), recebendo a denominação CRISPR apenas em 2002 (JANSEN et al. 2002).

Cada loco CRISPR é constituído por conjuntos de motivos, sendo cada motivo formado por uma repetição direta ou DR (*Direct Repeat*) de aproximadamente 24 a 47 pares de base (pb), seguida por uma sequência espaçadora. Em uma das extremidades do loco existe uma DR truncada, denominada degenerada, e na extremidade oposta uma sequência Líder, rica em A-T, que parece funcionar como o sítio promotor da transcrição. A figura 7 mostra um esquema representativo da organização dos locos CRISPR (JANSEN et al. 2002; MOJICA et al. 2000).

Figura 7: Esquema representativo dos locos CRISPR. Sequência líder em azul claro, repetições diretas (DR) em amarelo, e sequências espaçadoras em diferentes cores.

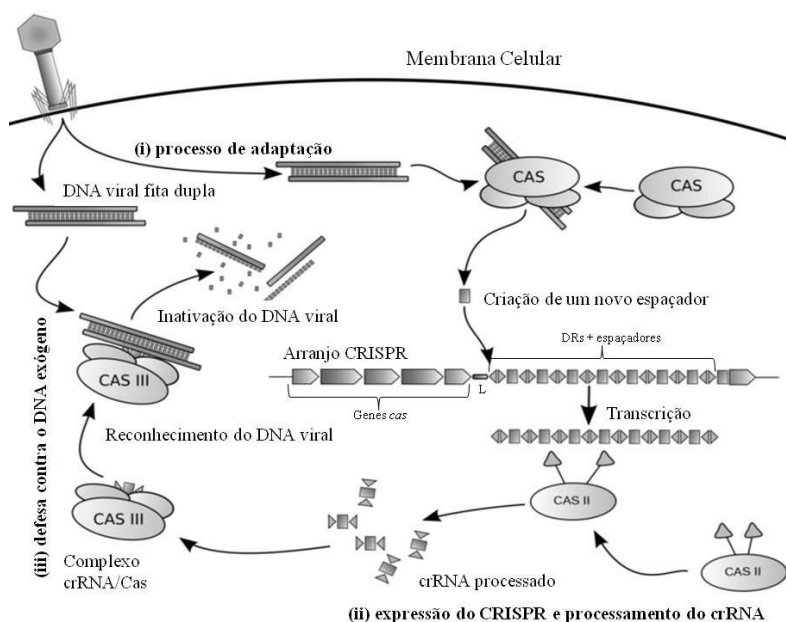


Fonte: Adaptado de <http://crispr.u-psud.fr/crispr>

Comparações entre os locos CRISPR de diferentes espécies mostraram que as DRs são idênticas em um determinado loco, porém podem possuir sequências diferentes em cada loco. Já as sequências espaçadoras variam em relação à sequência de nucleotídeos e ao número e à ordem em que se encontram em cada loco (JANSEN et al. 2002).

Em associação com as proteínas Cas (*CRISPR associated protein*), os locos CRISPR formam um sistema imunológico adaptativo que protege a bactéria contra fagos e plasmídios, além de participar de atividades regulatórias a nível transcricional (AL-ATTAR et al. 2011). O mecanismo completo de defesa através do complexo CRISPR/Cas compreende três etapas, conforme mostrado na figura 8: a adaptação do loco CRISPR (i) ocorre após a infecção e compreende a integração de uma pequena sequência do DNA exógeno na forma de um novo espaçador ao loco CRISPR, processo promovido pelas proteínas Cas. Quando ocorre expressão do loco CRISPR (ii) o transcrito primário é processado em pequenos RNAs, denominados crRNAs, também por ação de proteínas Cas. Numa segunda exposição ao mesmo DNA exógeno (iii) o complexo formado pelos crRNA recém formados e outras proteínas Cas, denominado CASCADE (*CRISPR Associated Complex for Antiviral Defense*) promove a inativação do DNA exógeno, evitando a infecção (BHAYA; DAVISON; BARRANGOU, 2011; OOST et al. 2009).

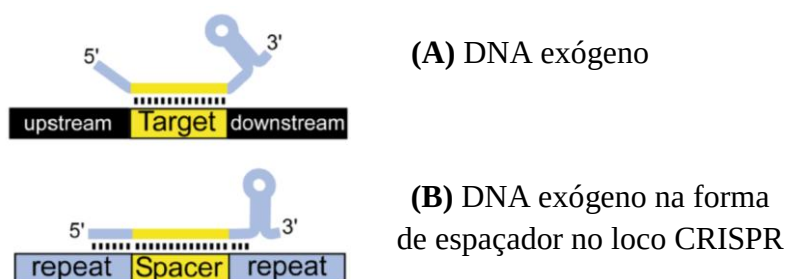
Figura 8. Esquema do mecanismo de defesa baseado no complexo CRISPR/Cas. **(i)** processo de adaptação após a invasão do DNA exógeno; **(ii)** expressão do loco CRISPR e processamento do crRNA; **(iii)** defesa contra o DNA exógeno através do reconhecimento do DNA pelo complexo crRNA/Cas. DRs representados em triângulos e espaçadores em retângulos. L: sequência Líder.



Fonte: Adaptado de OOST et al. 2009.

Em *Staphylococcus epidermidis* diferenças no pareamento entre o crRNA e a sequência do DNA exógeno, comparado ao pareamento que ocorre entre o crRNA e a sequência homóloga na forma de espaçador existente no loco CRISPR permitem à bactéria discriminar a sequência própria da exógena, desencadeando o processo de defesa e evitando reações auto-imunes. A figura 9 ilustra um pareamento incompleto entre o crRNA e o DNA exógeno, o que desencadeia o processo de defesa por meio da ação do complexo CASCADE. Já a mesma sequência na forma de espaçador é flanqueada por DRs, possibilitando um pareamento completo e evitando a ação do complexo de defesa (MARRAFFINI; SONTHEIMER 2010).

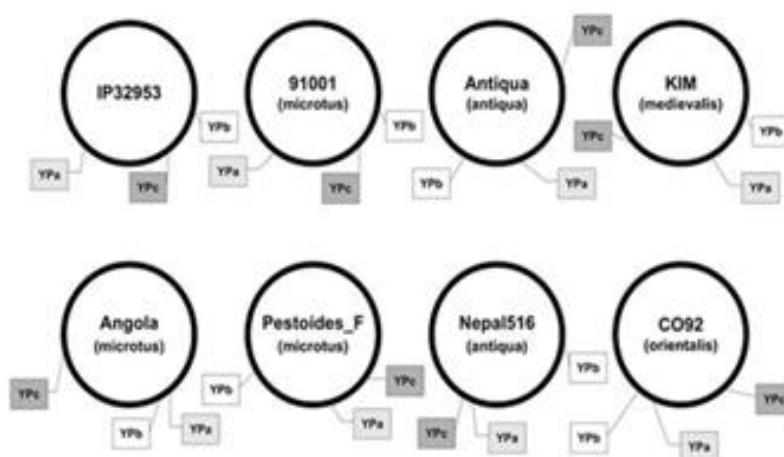
Figura 9. Modelo geral de prevenção auto-imune do complexo CRISPR/Cas. (A): reconhecimento apenas das sequências espaçadoras. (B): reconhecimento da sequência espaçadora e porções das DRs.



Fonte: Adaptado de MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010.

No cromossomo da *Y. pestis* existem três locos CRISPR denominados YP1, YP2 e YP3 por Pourcel; Salvignol; Vergnaud (2005), e YPa, YPb e YPc por Cui et al. (2008). Estes locos possuem localização física variável (figura 10), podendo ser encontrados em diferentes posições do cromossomo devido a rearranjos ocorridos no DNA da bactéria. De acordo com Cui et al. (2008), a organização e distribuição dos espaçadores nas cepas de *Y. pestis* está relacionada com a região e foco de peste, permitindo a construção de uma hipótese microevolutiva dos isolados.

Figura 10. Figura esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no cromossomo de cepas de *Yersinia pestis* sequenciadas.



Fonte: CUI et al. 2008.

Seis genes *cas* já foram identificados próximos ao loco YPa (*cas1*, *cas3*, *csy1*, *csy2*, *csy3*, *cas6f*), pertencentes ao subtipo Ypest, definido por Haft et al. (2005), porém nenhum relacionado aos locos YPb e YPc (CUI et al. 2008). Segundo Grissa; Vergnaud; Pourcel (2007) os locos YPb e YPc são secundários e derivados do loco YPa, que possui e provém toda “maquinaria” necessária para a atividade dos demais locos. De acordo com Pourcel; Salvignol; Vergnaud (2005), a evolução dos locos CRISPR pode ocorrer através de três eventos: supressões aleatórias de um ou mais espaçadores; adições, de forma polarizada, de novos motivos e duplicação de espaçadores.

Embora o funcionamento do complexo CRISPR/Cas ainda não seja completamente compreendido, pesquisas tem utilizado esta região para estudos de resistência bacteriana a fagos (HORVARTH et al. 2009), controle da disseminação de genes via transferência plasmidial (NOZAWA et al. 2011; PALMER; GILMORE 2010), genotipagem de cepas (ABADIA et al. 2010; CADY; O'TOOLE, 2011; CUI et al. 2008; MOKROUSOV et al. 2009; RIEHM et al. 2012) e dinâmica populacional microbiana (ANDERSSON; BANFIELD 2008; REZZONICO; SMITS; DUFFY, 2011).

Em estudos filogenéticos e de tipagem molecular, a análise dos locos CRISPR é baseada na identificação de polimorfismos em cada loco como resultado de eventos de adição, deleção, ou duplicação que ocorrem devido à exposição dos microrganismos a fagos e elementos extracromossomais presentes no ambiente. O conteúdo e a variabilidade dos locos CRISPR, mesmo em cepas intimamente relacionadas, provêm uma base genética para tipagem (BARRANGOU; HORVATH, 2009). Em *Y. pestis*, a localização cromossômica e a estabilidade genética destas regiões favorecem seu estudo (HORVATH et al. 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA, E. et al. **Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method.** Infection, Genetics and Evolution, v. 10, p.1066-1074, 2010.
- ANDERSSON, A.F., BANFIELD, J.F. **Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities.** Science, v. 320, p.1047-1050, 2008.
- ANISIMOV, A.P., LINDLER, L.E., PIER, G.B. **Intraespecific diversity of *Yersinia pestis*.** Clinical Microbiology Reviews, v.17, p.434-464, 2004.
- AL-ATTAR, S. et al. **Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes.** Biological Chemistry, v. 392, p. 277-289, 2011.
- ARAGÃO, A. I. et al. **Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos do Estado do Ceará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42(6), p. 711-715, 2009.
- BALTAZARD, M. **Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste.** Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, v.20, p. 335-366, 1968.
- BARRANGOU, R., HORVATH, P. **The CRISPR system protects microbes against phage and plasmids.** Microbe, v. 4, p. 224-230, 2009.
- BHAYA, D. DAVISON, M. BARRANGOU, R. **CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.** The Annual Review of Genetics, v.45, p. 273-297, 2011.
- BRASIL. Ministério da saúde/ Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de vigilância e controle da peste**, 1ª ed, Brasília, 2008.
- CADY, K.C., O'TOOLE, G.A. **Non-identity-mediated CRISPR-bacteriophage interaction mediated via the Csy and Cas3 proteins.** Journal of Bacteriology, v. 193, p. 3433-3445, 2011.
- CARNIEL, E. **The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island.** Microbes Infection, v. 3, p. 561-569, 2001.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Acessado em Julho de 2012. Disponível em <http://www.cdc.gov>.
- CORNELIS, G. R. **Molecular and cell biology aspects of plague.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97(16), p.8778-8783, 2000.
- CRISPRFINDER PROGRAM ON-LINE. Acessado em Julho de 2012. Disponível em: <http://crispr.u-psud.fr/Server/crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>.

- CUI, Y. et al. **Inside into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** PLoS ONE, v. 3, e2652, 2008.
- DERBISE, A. et al. **An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v.6(2), e1528, 2012.
- DONG, X.Q., LINDLER, L.E., CHU, M.C. **Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*.** Plasmid, v.43(2), p.144-148, 2000.
- DRANCOURT, M, RAOULT, D. **Molecular insights into the history of plague.** Microbes and Infection, v. 4, p. 105-109, 2002.
- DU, Y.A. et al. **Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis.** Infection and Immunity, v. 70, p. 1453-1460, 2002.
- DUPLANTIER J.M. et al. **From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence.** Veterinary Research, v. 36, p. 437-453, 2005.
- FILIPPOV, A. A. et al. **Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin.** FEMS Microbiology Letters, v. 67, p. 45-48, 1990.
- 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.
- GALIMAND, M. P. et al. **Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid.** The New England Journal of Medicine, v. 337, p. 677-680, 1997.
- GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. **The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats.** BMC Bioinformatics, v.8, p. 172, 2007.
- GUIYOULE, A. et al. **Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in clinical isolate of *Yersinia pestis*.** Emerging Infectious Diseases, v. 7, p. 43-48, 2001.
- HAFT, D.H. et al. **A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes.** PLoS Computational Biology, v.1(6), e60, 2005.
- HINNEBUSH, B. J.; PERRY, R. D.; SCHWAN, T. G. **Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas.** Science. v. 273, p. 367 - 370, 1996.
- HINNEBUSH, B. J. et al. **A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector.** Science, v. 296, p. 733-735, 2002.
- HINNEBUSCH, B. J. **Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flea vector of plague.** Advances in Experimental Medicine and Biology. v. 529, p. 55-62, 2003.
- HORVATH, P. et al. **Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*.** Journal of Bacteriology, v 190, p. 1401-1412, 2008.

- HORVATH P, et al. **Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes.** International Journal of Food Microbiology, v.131, p. 62-70, 2009.
- INGLESBY, T.V. et al. **Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working group on civilian biodefense.** Journal of The American Medical Association, v. 283, p. 2281-2290, 2000.
- ISHINO Y. et al. **Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.** Journal of Bacteriology, v. 169, p. 5429-5433, 1987.
- JANSEN, R. et al. **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** Molecular Microbiology, v.43, p. 1565-1575, 2002.
- KENNETH, CURTISS III. **Developing live vaccines against *Yersinia pestis*.** The Journal of Infection in Developing Countries, v. 5(9), p.614-627, 2011.
- LEAL, et al. **Homology among extra-cryptic DNA bands and typical plasmids in brasilian *Yersinia pestis*.** Brazilian Journal Microbiology. v. 31, p. 20-24, 2000.
- LEAL-BALBINO, T.C. et al. **Peste e Tularemia.** In: Marcondes CB (ed) Doenças transmitidas e causadas por artrópodes, cap. 5, p. 69-83, 2009.
- LINGON, B.L. **Plague: A review of its history and potential as a biological weapon.** Seminars in Pediatric Infectious Disease, v. 17, p. 161-170, 2006.
- MARRAFFINI, L.A., SONTHEIMER, E.J. **Self non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity.** Nature, v. 463, p. 568-571, 2010.
- MERHEJ, V. et al. ***Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, p. 779-784, 2008.
- MOJICA, F. J. et al. **Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.** Molecular Microbiology, v. 36, p. 244-246, 2000.
- MOKROUSOV, I. et al. **Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 28, p. 701-703, 2009.
- MOLLARET, H.H. **Le cas de la peste.** Annales de Démographie Historique, p. 101-110, 1989.
- MURROS-KONTIAINEN et al. ***Yersinia nurmii* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 61, p. 2368-2372, 2011a.
- MURROS-KONTIAINEN et al. ***Yersinia pekkanenii* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 61, p. 2363-2367, 2011b.
- NOZAWA, T. et al. **CRISPR Inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*.** PLoS ONE, v.6 (5), e19543, 2011.

- OOST, J. et al. **CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes.** Trends in Biochemical Sciences, v. 34, p. 401-407, 2009.
- PALMER, K.L., GILMORE, M.S. **Multidrug-resistant *Enterococci* lack CRISPR-cas.** *mBio* v.1(4), e00227-10, 2010.
- PERRY, R.; FETHERSTON, J.D. ***Yersinia pestis*: etiologic agent of plague.** Clinical Microbiology Reviews, v. 10, p. 35-66, 1997.
- POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. **CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies.** Microbiology, v. 151, p. 653-663, 2005.
- REZZONICO, F., SMITS, T.H.M., DUFFY, B. **Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*.** Applied and Environmental Microbiology, v.77, p. 3819-3829, 2011.
- RIEHM, J.M. et al. ***Yersinia pestis* lineages in Mongolia.** PLoS ONE, v. 7(2), e30624, 2012.
- SAAVEDRA, R.C.; DIAS, J.P. **Infecção por *Yersinia pestis*, no Estado da Bahia: controle efetivo ou silêncio epidemiológico?** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44(2), p.223-227, 2011.
- SMITH, J.H., REISNER, B.S. Plague. In: Connor, D.H., Chandler, F.W. (eds). **Pathology of Infectious Diseases.** Stamford, Connecticut, Appleton & Lange, p. 729-738. 1997.
- SPRAGUE, L.D. et al. ***Yersinia similis* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, p. 952-958, 2008.
- STENSETH, N.C. et al. **Plague: past, present, and future.** PLOS Medicine, v. 5, p. 9-13, 2008.
- SULAKVELIDZE, A. ***Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species.** Microbes and Infection, v. 2(5), p. 497-513, 2000.
- TAVARES, C. et al. **Plague in Brazil: from now and then.** Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 954, p. 69-77, 2012.
- WHO. Plague in the Americas. **Scientific Publication**, v. 115, 1965.
- WHO. **International meeting on prevention and controlling plague: the old calamity still has a future.** Weekly Epidemiological Record, v. 81(28), p.278-284, 2006.
- WHO. **International Health Regulations (2005)**, 2 ed, World Health Organization, Geneva, 2008.
- WHO. **Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004–2009.** Weekly Epidemiological Record, v. 85(6), p. 40-48, 2010.

ARTIGO

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Características dos locos CRISPR em cepas brasileiras de *Yersinia pestis* *Characteristics of CRISPR loci in Brazilian strains of Yersinia pestis*

Camila Tenorio França^{1,3}, Maria Betânia Melo de Oliveira², Alzira Maria Paiva de Almeida³

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Recife, PE, Brasil ²Departamento de Bioquímica da UFPE, Recife, PE, Brasil ³Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE, Recife, PE, Brasil

Palavras-chave: CRISPR, *Yersinia pestis*, peste, sequências espaçadoras, microevolução.

Email do autor de correspondência: ctfranca@cpqam.fiocruz.br

Manuscrito a ser submetido a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Locos CRISPR de *Yersinia pestis*, Brasil

CRISPR loci in Yersinia pestis, Brazil

Características dos locos CRISPR em cepas brasileiras de *Yersinia pestis*

Characteristics of CRISPR loci in Brazilian strains of Yersinia pestis

Camila Tenorio França^{1,3}, Maria Betânia Melo de Oliveira², Alzira Maria Paiva de Almeida³

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Bioquímica da UFPE, Recife, PE, Brasil ³Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente: Camila Tenorio França. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - *Campus* da UFPE, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife, PE, Brasil. Fone: 55 81 2101 2647, ctfranca@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

A caracterização genética das cepas de *Yersinia pestis*, agente causador da peste, tem importância para a epidemiologia molecular, vigilância dos focos e microbiologia forense. Análises por técnicas moleculares de alta resolução podem gerar dados que permitirão a comparação global das cepas dispensando o intercâmbio de culturas dessa bactéria classificada no nível 3 de risco biológico e classe A de bioterrorismo. Neste trabalho, três locos CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) YPa, YPb e YPc, foram analisados por PCR e sequenciamento em cepas brasileiras de *Y. pestis*. Foi observado que todas as cepas possuem os três locos, e 19 novas sequências espaçadoras, exclusivas das cepas analisadas, foram identificadas. Pela distribuição dos espaçadores nos três locos foram identificados 20 perfis genotípicos (P1-P20) entre as 98 cepas analisadas e foi observada uma correlação entre a presença dos espaçadores e a origem

geográfica das cepas. Entre os perfis genotípicos o P1 revelou-se o mais distribuído geograficamente e ao longo do tempo, encontrado nas cepas originadas de todos os focos e todo o período em que foram obtidas. Os outros perfis agruparam menor número de cepas, a maioria específica de uma cepa de um determinado foco. Em conclusão, as características específicas encontradas nos locos CRISPR das cepas brasileiras podem ser atribuídas a microevolução da bactéria devido à exposição a fagos e outros DNAs exógenos nos diferentes ambientes.

Palavras-chave: sequências espaçadoras, focos de peste, microevolução.

ABSTRACT

Genetic characterization of *Yersinia pestis* strains, the causative agent of plague, is important to molecular epidemiology, surveillance and forensic microbiology. High resolution molecular technique analysis generate data as to allow combination and comparison of strains, avoiding cultures exchange of this dangerous bacteria level 3 biosafety and class A biohazard. In this work, three CRISPR *loci* (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) YPa, YPb and YPc were analyzed by PCR and sequencing in *Y. pestis* Brazilian strains. It was observed that all strains have the three *loci*, and 19 new spacers, exclusive from the studied strains, were identified. According to the spacers' distribution in the three *loci*, 20 genotypes (P1-P20) were identified among the 98 strains analyzed, and a correlation was observed between the spacers' presence and geographical origin of strains. The P1 genotype was the most distributed spatially, in strains originated from all *foci*, and during the period which the strains were obtained. The other genotypes grouped fewer strains, mostly a single strain from one specific *focus*. In conclusion, the specific characteristics of CRISPR *loci* found in Brazilian strains can be assigned to the *Y. pestis*

microevolution due to the exposure to phages and other exogenous DNAs in different environments.

Key words: spacers, plague *foci*, microevolution.

Financiamento: Serviço Nacional de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP / CPqAM-FIOCRUZ/PE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Edital MCT / CNPq 14/2009 - Universal, Processo N ° 482694/2009-2.

INTRODUÇÃO

Yersinia pestis é uma bactéria gram-negativa da família Enterobacteriaceae e agente causador da peste, uma doença primária de roedores transmitida usualmente por pulgas, que pode infectar os seres humanos e outros mamíferos (Perry & Fetherston 1997).

Admite-se que a *Y. pestis* evoluiu da *Yersinia pseudotuberculosis* cerca de 1.500 - 20.000 anos atrás, antes da primeira pandemia ocorrida no início da era Cristã. A partir do Planalto Centro Asiático, por meio de duas pandemias - a segunda na Idade Média e a terceira, contemporânea - se disseminou pelo mundo (Acthman et al. 1999; Perry & Fetherston 1997).

Baseado em dados históricos e epidemiológicos, e na análise dos resultados de reações de fermentação de Glicerol e redução de Nitrato em Nitrito em cepas de coleção, Devignat (1951) identificou 3 variedades geográficas ou biovares - *Antiqua*, *Mediaevalis* e *Orientalis* ou *Oceânica*, os quais associou a cada uma das pandemias. Trabalhos mais recentes subdividem a *Y. pestis* em biovares agrupados nas subespécies *pestis* (os 3 biovares clássicos) em *microtus* (ou *pestoides*) que agrupa os biovares *Caucásica*, *Ulegeica*, *Altaica*, *Hissarica*, e *Talassica*, encontrados nos focos da antiga União Soviética, na sua maioria não patogênicos para humanos (Anisimov et al. 2004), além

de *Xilingolensis* e *Qinghaiensis* dos focos da China (Li et al. 2009). A nomenclatura dos focos naturais dos diversos países e da sub-tipagem das cepas de *Y. pestis* ainda não está uniformizada (Anisimov et al. 2004; Li et al. 2009).

Introduzida no Brasil em 1899 por via marítima pelo porto de Santos-SP, durante a última pandemia originada na China, a peste dispersou-se por via terrestre pelas cidades do interior e finalmente fixou-se entre as espécies de roedores autóctones em vários complexos ecológicos, constituindo os chamados focos do Nordeste (Serras da Ibiapaba, Baturité, Triunfo, do Espinhaço, Chapadas do Araripe, da Diamantina e Planalto da Borborema) e o da Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro (Tavares et al. 2012; WHO 1965).

Atualmente, a peste persiste arraigada em numerosos focos naturais em todos os continentes, exceto Oceania, com aparente tendência de aumento do número de casos e dispersão geográfica. A análise das ocorrências mostra que ela pode reaparecer após longos períodos sem novos casos, e a facilidade de locomoção favorece o transporte de infectados para áreas indenes, podendo gerar uma situação de emergência internacional (Stenseth et al. 2008; WHO 2010). O Regulamento Sanitário Internacional (RSI) determina a manutenção de serviços de vigilância contra doenças que possam repercutir no intercâmbio internacional - entre elas a peste pneumônica - e a notificação imediata à Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a ocorrência de casos dessas doenças (WHO 2008).

Os resultados de estudos por técnicas moleculares de alta resolução como as análises de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat* (VNTR ou MLVA), e das sequências *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) em cepas de peste dos diversos focos do mundo têm fornecido dados importantes para compreensão da evolução temporal e da disseminação mundial da bactéria (Cui et al. 2008; Li et al. 2009; Moreli et al. 2010; Pourcel et al. 2004; Pourcel et al. 2005; Riehm et al. 2012; Vogler et al. 2011). A organização de um banco de dados global sobre as características das cepas permitirá a

combinação e comparação, dispensando o intercâmbio e o transporte de culturas dessa bactéria classificada no nível 3 de risco biológico e classe A de bioterrorismo.

No presente trabalho, três locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) YP1, YP2 e YP3 (Pourcel et al. 2005) ou YPa, YPb e YPc (Cui et al. 2008) foram analisados em cepas brasileiras de *Y. pestis* (biovar *Orientalis*) (Tavares et al. 2012) por meio de amplificação por PCR e sequenciamento dos amplicons.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas estudadas e condições de cultura - Neste estudo foram analisadas 98 cepas de *Y. pestis* (biovar *Orientalis*) obtidas da coleção Fiocruz-CYP, mantida pelo Serviço Nacional de Referência em Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE (tabela I). Foram selecionadas cepas representativas de cinco focos de peste do Nordeste do Brasil isoladas de pacientes, roedores hospedeiros e pulgas vetores no período de 1966 a 1997. As cepas são identificadas como P (peste), local de isolamento ou origem (Exu, CE ou PB), número de ordem do isolamento (Almeida et al. 1985, 1989). As culturas originais de algumas amostras foram substituídas por subcultivos que estão identificados como 1S ou 2S, referente ao subcultivo. As cepas são conservadas em tubos de gelose peptonada a +4°C no Laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB3), e para este trabalho foram reativadas por semeio em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - HIMEDIA), incubadas a 28°C durante 18-24h e em seguida crescidas em *Blood Agar Base* (BAB - HIMEDIA) a 28°C por 24-72h. A confirmação da identificação e da pureza das colônias foi realizada em placas de BAB a partir de culturas individuais das colônias crescidas em caldo, utilizando o bacteriófago específico antipestoso (Karimi 1978).

Extração do DNA - A extração do DNA genômico foi realizada pela técnica de lise térmica baseada em Keim et al. (2000). Para cada cultura, uma alça de colônias crescidas em BAB foi ressuspensa em 200µl de TE 10:1 (10mM de Tris-HCl pH 8.0; 1mM de EDTA) e submetida à fervura em banho-maria por 20 minutos, seguido por resfriamento à temperatura ambiente por 5-10 minutos e centrifugação a 14.000rpm por 2-3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a -20°C para as análises.

Amplificação dos locos CRISPR e da sequência Líder - *Y. pestis* possui três locos CRISPR: YPa, YPb, YPc *alias* YP1, YP2, YP3 cada loco composto por uma sucessão de motivos formados por repetições diretas (DR, *Direct Repeat*) de 28 pares de base (pb) e sequências espaçadoras de 31 a 33pb. Geralmente o loco começa com uma DR degenerada ou truncada e na extremidade oposta encontra-se uma sequência Líder, sítio promotor da transcrição (Vergnaud et al. 2007).

Para amplificação dos locos CRISPR por PCR foram usados os *primers* descritos por Pourcel et al. (2005) e para amplificação da sequência Líder os *primers* desenhados para este estudo por meio dos programas *Primer 3* (Rozen & Skaletsky 2000) e *AutoDimer* (Vallone & Butler 2004): CRISPR YPa Forward (5'-GGGGGAGACATATTTATAGGC-3'), CRISPR YPb Forward (5'-GGTTCAGGGGAGTGGTTATC-3') e CRISPR YPc Forward (5'-ACCGGATAGCGGATAATGC-3'), usando como Reverse as sequências descritas como Forward em Pourcel et al. (2005).

As reações foram preparadas em um volume final de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA genômico, 20pmol de cada *primer*, 50mM de tampão (pH 8), 0,16mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 1U da enzima *TaqDNA* polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas segundo Le Flèche et al. (2001), e em todas foi incluído um controle negativo contendo apenas a mistura da reação sem adição de DNA.

A confirmação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com *SYBR Safe* (Invitrogen, Brasil), com o uso do marcador de peso molecular *100bp DNA ladder* (Invitrogen, Brasil), visualização em luz ultravioleta e digitalização pelo software *ID image analysis 3.5* (Kodak Digital Science, EUA).

Purificação e sequenciamento - Os amplicons gerados por PCR foram purificados usando o kit *purelink PCR purification* (Invitrogen, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA purificado foi realizada no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O sequenciamento foi realizado com os mesmos *primers* da PCR, usando o *Bigdye Kit* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems) pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM - FIOCRUZ/PE. Cada amplicon foi sequenciado em triplicata.

Análise dos locos CRISPR - As sequências foram montadas e analisadas usando os softwares SeqmanTM II e MegAlignTM *expert sequence analysis* (DNASTAR, Inc); o alinhamento múltiplo das DRs foi feito por meio do MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007); e a análise do conteúdo GC pelo Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc). A estrutura completa de cada loco foi comparada com dados depositados no CRISPRFinder (Grissa et al. 2007), com pesquisa de sequências homólogas no banco de dados do NCBI por meio do BLASTn (Altschul et al. 1997). Os locos CRISPR descritos para a cepa CO92 por Pourcel et al. (2005) foram usados como padrão para organização dos locos das amostras estudadas. A nomenclatura dos novos espaçadores identificados neste estudo está de acordo com a nomenclatura internacional (Cui et al. 2008 e Riehm et al. 2012).

RESULTADOS

Amplificação dos locos CRISPR - Houve amplificação dos três locos CRISPR nas 98 cepas analisadas. O loco YPa, gerou seis alelos de 449 a 630 pb, o YPb quatro, de 271 a 392 pb e o YPc apenas um, de 331 pb. O número de motivos [compostos de uma DR e um espaçador], variou de sete a 10 no loco YPa e de quatro a seis no YPb. O loco YPc apresentou apenas três motivos em todas as cepas (figura 1).

Repetições diretas (DRA) e sequência Líder - As DRA dos três locos apresentam sequência de nucleotídeos idêntica, com 28 pb: 5'-TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'. Em cada loco foi encontrado um tipo de DR degenerada: YPa 5'-TTTGATTATTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'; YPb 5'-TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'; YPc 5'-TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3' que diferem de três a seis nucleotídios em relação as DRA. A quantidade de DRs no loco YPa variou de 8 a 11 por cepa, e no YPb de 5 a 7. O loco YPc foi composto por 4 DRs em todas as cepas analisadas (figura 1).

As sequências Líder de todos os locos das cepas analisadas possuem a mesma sequência nucleotídica composta de 200 pb.

Sequências espaçadoras - A exceção de duas cepas, todas as demais apresentaram o mesmo conjunto de espaçadores: “a1a2a3a5a6a7a8” no loco YPa, “b1b2b3b4b5” no YPb e “c1c2c3” no YPc. Na cepa P.Exu540 foi observada deleção do espaçador “a2” e na P.Exu803 do espaçador “b3”. Neste estudo, 19 novos espaçadores foram identificados: 15 no loco YPa (nomeados a89-a103) e quatro no loco YPb (nomeados b50-b53); nenhum novo espaçador foi identificado no loco YPc (figura 1). O conteúdo percentual de GC médio observado nos novos espaçadores foi de 43%. Nove (47,4%) são similares a sequências virais, quatro (21,0%) a sequências plasmidiais e seis (31,6%) a sequências cromossomais (tabela II).

Distribuição dos espaçadores pela origem geográfica das cepas - Foi observada uma correlação entre a presença dos novos espaçadores nos locos YPa e YPb e a origem geográfica das cepas analisadas: no loco YPa, um espaçador (a89) é específico das cepas da Serra da Ibiapaba-CE, 11 (a91, a92, a93, a94, a95, a96, a97, a98, a99, a100, a101 e a102) da Chapada do Araripe-PE, e um (a103) do Planalto da Borborema-PB. No loco YPb, dois espaçadores (b50 e b52) são específicos das cepas da Chapada do Araripe-PE, um (b51) da Serra do Baturité-CE, e um (b53) do Planalto da Borborema-PB.

Perfis genotípicos - A observação do arranjo dos espaçadores presentes nos três locos das 98 cepas analisadas possibilitou agrupá-las em 20 perfis genotípicos, denominados neste estudo P1 a P20. Sessenta e oito (69,4%) das cepas foram agrupadas no perfil P1, sete (7,1%) no P13, quatro (4,1%) no P14 e três (3,1%) no P18. Os demais perfis foram encontrados em uma única cepa de um foco (tabela I).

Distribuição temporal dos perfis genotípicos - O perfil P1 (69,4% das cepas) foi encontrado em cepas de todo o período de estudo: 1966 a 1997. Dez (62,5%) das 16 cepas isoladas de uma epizootia em uma localidade na Chapada do Araripe-PE em 1967 e 16 (88,9%) das 18 cepas de um surto de peste no Planalto da Borborema-PB em 1986 foram agrupadas neste perfil (tabela I).

Os demais perfis, agrupando menor número de cepas, foram identificados em cepas de diferentes anos em todos os focos, exceto os de Triunfo-PE e da Bahia (tabela I).

Distribuição geográfica dos perfis genotípicos - O perfil P1 foi o mais disseminado geograficamente, presente em todos os focos estudados, inclusive na única cepa analisada do estado da Bahia e todas as cepas do foco de Triunfo-PE (tabela I).

O perfil P13 (7,1% das cepas) foi encontrado apenas em cepas da Serra da Ibiapaba-CE; o P18 (3,1% das cepas) na Serra do Baturité-CE; e o P14 (4,1% das cepas) nos dois focos do Ceará (três da Serra do Baturité e uma da Serra da Ibiapaba).

Os demais perfis são exclusivos de uma cepa de cada foco específico (tabela I). A distribuição dos perfis pelos diferentes focos é mostrada na figura 2.

Distribuição dos perfis genotípicos por fonte de isolamento - o P1 agrupou cepas isoladas de humanos (17), roedores das espécies *Necromys lasiurus* (26), *Rattus rattus* (9), *Oryzomys subflavus* (7), *Oligoryzomys eliurus* (1) e *Holochilus sciureus* (1), e de pulgas das espécies *Polygenis bolhsi jordani* (4), *Xenopsylla cheopis* (1) e *Pulex irritans* (1). O P13 também agrupou cepas isoladas de humano (1) e de roedores *N. lasiurus* (4), *Calomys calosus* (1) e sem identificação, e o P14 agrupou cepas isoladas de humanos (2) e de roedor *C. calosus* (1) (tabela I). Os demais perfis são específicos de cepas de uma única fonte (cinco de humanos, oito de roedores e três de pulgas).

DISCUSSÃO

Os conhecimentos sobre a estrutura das populações da *Y. pestis* e sua dispersão e microevolução após sua entrada no Brasil são ainda incipientes. Os resultados das análises realizadas no presente estudo nos três locos CRISPR de cepas representativas dos diversos focos de peste do Nordeste do Brasil revelaram novos aspectos das cepas brasileiras.

Todas as cepas analisadas nesse estudo possuem os três locos (YPa, YPb e YPc) e como observado por Pourcel et al. (2005) em amostras dos três biovars clássicos, de diversas origens geográficas, o loco YPa revelou-se o mais polimórfico, seguido pelo YPb. O polimorfismo do loco YPa foi também observado por Cui et al. (2008) nas cepas de focos da Ásia Central.

Pela comparação com a cepa CO92 (Pourcel et al. 2005) foi observado que 69,4% (n=68) das cepas brasileiras apresentam a mesma composição e número de motivos (01 DR + 01 espaçador) da padrão (CO92) e 30,6% (n=30) possuem diferenças na composição e número de motivos. Segundo Pourcel et al. (2005), a evolução dos locos CRISPR pode ocorrer por meio supressões aleatórias de um ou mais espaçadores; adições, de forma polarizada, de novos motivos e duplicação de espaçadores. Dois desses mecanismos (adição e supressão de motivos) podem justificar as diferenças na composição e número de motivos nas cepas analisadas, resultantes do acréscimo ou da perda de motivos próximos à extremidade adjacente a sequência Líder. As incorporações e perdas de motivos nos locos YPa e YPb sugerem que estes locos se encontram ativos e a ausência de alterações no loco YPc sugere inatividade. Eventos semelhantes, adições e deleções de motivos, também foram observados em cepas de focos do leste europeu, África, Ásia e EUA por Pourcel et al. (2005) e focos da Ásia Central por Cui et al. (2008).

Os dois tipos de DR (DRA e DR degenerada) da cepa CO92 (Pourcel et al. 2005) e 18 dos 137 espaçadores depositados no GeneBank foram também encontrados nas cepas brasileiras analisadas. Adicionalmente 19 novos espaçadores ainda não descritos foram identificados: 15 no loco YPa e quatro no YPb. Segundo Pourcel et al. (2005) novos espaçadores não são sintetizados *de novo*, resultam de incorporação, sendo cópias de sequências de DNA exógeno ao qual a bactéria foi exposta. O conteúdo GC% médio dos novos espaçadores identificados nas cepas deste estudo, cerca de 4,7% inferior ao GC% do genoma da cepa CO92 (Pourcel et al. 2005), e a similaridade observada com sequências depositadas em bancos de dados permite supor que tiveram origem de sequências virais, plasmidiais e cromossomais (tabela 2). Não é possível descartar a possível incorporação de DNA plasmidial ao DNA cromossomal, evento já observado em algumas cepas de *Y. pestis* durante estocagem prolongada (Leal et al. 2000).

Nos estudos em cepas de *Y. pestis* de focos da Ásia Central Cui et al. (2008) observaram que existe uma correlação entre a distribuição dos espaçadores nos locos e a origem geográfica das cepas. Segundo esses autores os espaçadores mais próximos da sequência Líder foram os adquiridos mais recentemente e são específicos de cada foco e, por isso, foram denominados Espaçadores Região-Específica ou RSSs (*Region-Specific Spacer*), enquanto os espaçadores localizados mais distantes da sequência Líder, frequentemente conservados, foram denominados Espaçadores Espécie-Específicos ou SSSs (*Species-Specific Spacers*). No nosso estudo também foi possível estabelecer uma correlação entre a distribuição dos espaçadores e a origem geográfica das cepas, e os novos espaçadores identificados, exclusivos de cepas de focos do Brasil, podem ser considerados RSS.

O mesmo conjunto de espaçadores da cepa padrão CO92 “a1a2a3a4a5a6a7a8” no loco YPa, “b1b2b3b4b5” no loco YPb, e “c1c2c3” no YPc foram encontrados em quase todas as cepas brasileiras. Estes espaçadores conservados nas cepas de diferentes origens são considerados específicos da espécie, ou SSSs (Cui et al. 2008). A variação observada nas cepas P. Exu 340 (deleção do espaçador “a3” no loco YPa) e P. Exu 803 (deleção do espaçador “b3” no loco YPb) pode ser atribuída à perda aleatória de um motivo, como consequência de recombinação homóloga entre DRs adjacentes segundo descrito por Cui et al. (2008).

Nas cepas da Chapada do Araripe foi observada maior variabilidade de espaçadores, que pode ser atribuída ao maior número de cepas estudadas desse foco. Não se pode, no entanto, desconsiderar a influência do ambiente na heterogeneidade genética observada. *Y. pestis* possui uma ampla variedade de hospedeiros e vetores que também possuem o seu próprio ambiente, resultando em alta diversidade de micro-ambientes ecológicos para a bactéria (Perry & Fetherston 1997). Durante a sua expansão e adaptação nos novos nichos, o genoma da bactéria sofre considerável

variabilidade em resposta à pressão ambiental que se reflete na diversidade genômica das cepas nos diferentes focos (Zhang et al. 2009).

Os 20 perfis genotípicos (P1-P20) identificados no nosso estudo evidenciam diversidade intraespecífica entre as cepas analisadas. O perfil P1, idêntico ao da cepa padrão CO92 foi o mais conservado, mais frequentemente encontrado nas cepas isoladas de 1966 a 1997 e o mais disseminado entre as cepas provenientes de todos os focos (Serra da Ibiapaba e Serra do Baturité-CE, Triunfo e Chapada do Araripe-PE, Planalto da Borborema-PB e da Bahia). A ocorrência de cepas com o mesmo perfil (P1) em todas as áreas geográficas e em todo o período confirma a introdução de um único clone da bactéria no país (WHO 1965). Por outro lado, pode sugerir algum mecanismo genético, ainda desconhecido, que impediu a aquisição de novos espaçadores pelas cepas apesar das pressões ambientais.

Perfis específicos da bactéria em cada foco foram também identificados, revelando subpopulações distintas separadas geograficamente.

Dentre as cepas analisadas no presente trabalho, 16 são originadas de uma epizootia de peste em uma localidade restrita na Chapada do Araripe-PE em 1967, e 18 durante um surto em 1986, em uma área extensa no Planalto da Borborema-PB (Almeida et al. 1985, 1989; Oliveira et al. *in press*; Tavares et al. 2012). O mesmo perfil genotípico (P1) foi encontrado em 10 (62,5%) das 16 cepas isoladas durante a epizootia. A relativa homogeneidade desse grupo de cepas foi também observada pela análise de 12 locos VNTR (*Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat*) por Oliveira et al. (*in press*). O perfil P1 também agrupou 16 (88,9%) das 18 cepas do surto no Planalto da Borborema-PB. Pela análise de 12 locos VNTR este grupo de cepas mostrou-se mais heterogêneo (Oliveira et al. *in press*).

Em relação aos hospedeiros e vetores, o perfil P1 também foi o mais encontrado nas cepas isoladas do roedor *N. lasiurus* e suas pulgas *P. b. jordanii*. Segundo Baltazard (2004) este roedor e suas pulgas desempenham um importante papel na disseminação da peste nos focos do Nordeste do Brasil.

Em conclusão, a análise dos locos CRISPR revelou características genéticas específicas das cepas brasileiras de *Y. pestis* que podem ser atribuídas à microevolução da bactéria em consequência às exposições sofridas ao longo do tempo a fagos e outros DNAs exógenos, nos diferentes ambientes dos diversos focos do país.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

REFERÊNCIAS

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14043-14048.
- 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* 27: 207-218.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, de Melo ME, do Rêgo RV, de Almeida CR 1989. Bacteriologic and serologic studies of an outbreak of plague in the State of Paraíba, Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 249-256.

- Altschul SF, Maden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB 2004. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Rev* 17: 434-464.
- Baltazard M 2004. Recherches sur la peste au Brésil. 4^{ème} rapport. *Bull Soc Pathol Exot* 97: 93-117.
- Cui Y, Li Y, Gorge O, Platonov ME, Yan Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Balakhonov SV, Wang X, Song Y, Anisimov AP, Vergnaud G, Yang R 2008. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS ONE* 3: e2652.
- Devignat R 1951. Varieties of *Pasteurella pestis*; new hypothesis. *Bull World Health Organ* 4: 247-263.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35: W52-7.
- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF, Layton M, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Schoch-Spana M, Tonat K 2000. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 283: 2281-2290.
- Karimi Y 1978. Diagnostic rapid de l'infection pesteuse au laboratoire. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 71: 45-48.

- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182: 2928-2936.
- Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G 2001. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 1:2.
- Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Anisimov AP, Yang R, Vergnaud G 2009. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One* 4: e6000.
- Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, Feldkamp M, Kusecek B, Vogler AJ, Li Y, Cui Y, Thomson NR, Jombart T, Leblois R, Lichtner P, Rahalison L, Petersen JM, Balloux F, Keim P, Wirth T, Ravel J, Yang R, Carniel E, Achtman M 2010. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat Genet* 42: 1140-1143.
- Oliveira MBM, Barros MPS, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, Balbino VQ, Leal NC, Almeida, AMP, Leal-Balbino, TC. The genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet Mol Res*, in press.
- Perry RD, Fetherston JD 1997. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10: 35-66.
- Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* 4: 22.

- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151: 653-663.
- Riehm JM, Vergnaud G, Kiefer D, Damdindorj T, Dashdavaa O, Khurelsukh T, Zöller L, Wölfel R, Le Flèche P, Scholz HC 2012. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS ONE* 7: e30624.
- Rozen S, Skaletsky HJ 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* Humana Press, Totowa, p. 365-386.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, Gage KL, Leirs H, Rahalison L 2008. Plague: past, present, and future. *PLoS Med* 5(1):e3.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tavares C, Aragão AI, Leal NC, Leal-Balbino TC, de Oliveira MB, de Oliveira Gonçalves Ferreira GM, de Almeida AM 2012. Plague in Brazil: from now and then. *Adv Exp Med Biol* 954: 69-77.
- Vallone PM, Butler JM 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques* 37: 226-231.
- Vergnaud G, Li Y, Gorgé O, Cui Y, Song Y, Zhou D, Grissa I, Dentovskaya SV, Platonov ME, Rakin A, Balakhonov SV, Neubauer H, Pourcel C, Anisimov AP, Yang R 2007. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. *Adv Exp Med Biol* 603: 327-338.

- 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. *Scientific Publication* 115:156.
- WHO 2008. *International health regulations (2005)*, 2 ed, World Health Organization, Geneva, 74 pp.
- WHO 2010. Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004 - 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 40-48.
- Zhang X, Hai R, Wei J, Cui Z, Zhang E, Song Z, Yu D 2009. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiol* 9: 205.

TABELA I

Características gerais das cepas de *Yersinia pestis* estudadas

Cepa	Ano de Isolamento	Foco	Fonte	Conjunto de espaçadores			Perfil Genotípico
				YPa	YPb	YPc	
P. Exu 30 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 31 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Xenopsylla cheopis</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 36 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8+a102	b1-b5	c1-c3	P4
P. Exu 39 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 42 (1s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 42 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 44 (1s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a95	b1-b5	c1-c3	P5
P. Exu 47 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 48 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 53 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 54 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a96	b1-b5	c1-c3	P6
P. Exu 57 (1s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 57 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 59 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8+a101	b1-b5	c1-c3	P7
P. Exu 60 (1s) *	1967	Araripe-PE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 60 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 61 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a36+a97	b1-b5	c1-c3	P8
P. Exu 67 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8 + a98+a99	b1-b5	c1-c3	P9
P. Exu 74 (2s) *	1967	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 862♦	1986	Borborema-PB	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 864♦	1986	Borborema-PB	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 865♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5+b53	c1-c3	P19
P. PB 866♦	1986	Borborema-PB	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8+a93+a103	b1-b5	c1-c3	P20
P. PB 867♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 868♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 869♦	1986	Borborema-PB	<i>Holochilus sciureus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 870♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 871♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 872♦	1986	Borborema-PB	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 873♦	1986	Borborema-PB	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 874♦	1986	Borborema-PB	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 876♦	1986	Borborema-PB	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 877♦	1986	Borborema-PB	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 878♦	1986	Borborema-PB	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 879♦	1986	Borborema-PB	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 880♦	1986	Borborema-PB	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. PB 881♦	1986	Borborema-PB	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 01	1978	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 03	1979	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 04	1979	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. CE 05	1979	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. CE 06	1979	Ibiapaba-CE	Roedor (s/i)	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. CE 07	1979	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. CE 09	1980	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 11	1982	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 13	1982	Baturité-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 14	1982	Ibiapaba-CE	<i>Pulex irritans</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 17	1982	Baturité-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a90	b1-b5+b51	c1-c3	P18
P. CE 18	1982	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 19	1982	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 21	1982	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 24	1982	Baturité-CE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. CE 25	s/i	s/i-CE	s/i	a1-a8 + a90	b1-b5+b51	c1-c3	P18
P. CE 28	1983	Baturité-CE	Roedor (s/i)	a1-a8 + a90	b1-b5+b51	c1-c3	P18
P. CE 30	1986	Ibiapaba-CE	<i>Calomys calosus</i>	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. CE 882	1997	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 509	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 527	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 538	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 540	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 542	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1

...continuação da tabela I

Cepa	Ano de Isolamento	Foco	Fonte	Composição do loco			Perfil Genotípico
				YPa	YPb	YPc	
P. Exu 554	1971	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 556	1972	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 558	1972	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 789	s/i	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. Exu 792	1978	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 795	1978	Baturité-CE	Humano	a1-a8 + a90	b1-b5	c1-c3	P14
P. Exu 796	1978	Baturité-CE	Humano	a1-a8 + a90	b1-b5	c1-c3	P14
P. Exu 797	1978	Ibiapaba-CE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8 + a24	b1-b5	c1-c3	P15
P. Exu 801	1978	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 803	1978	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8	b1-b2;b4-b5	c1-c3	P16
P. Exu 806	1978	Baturité-CE	<i>Calomys callosus</i>	a1-a8 + a90	b1-b5	c1-c3	P14
P. Exu 809	1979	Ibiapaba-CE	Humano	a1-a8 + a90	b1-b5	c1-c3	P14
P. Exu 835	1979	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 842	s/i	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8 + a89	b1-b5	c1-c3	P13
P. Exu 861	s/i	Ibiapaba-CE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 03	1966	Araripe-PE	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5+b52	c1-c3	P2
P. Exu 12	1966	Araripe-PE	<i>Oligoryzomys eliurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 19	1967	Araripe-PE	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 184	1967	Araripe-PE	Humano	a1-a8 + a91+a92	b1-b5	c1-c3	P3
P. Exu 241	1968	Araripe-PE	<i>Rattus rattus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 334	1969	Araripe-PE	Humano	a1-a8+a100	b1-b5	c1-c3	P10
P. Exu 340	1969	Araripe-PE	Humano	a1; a3 - a8	b1-b5	c1-c3	P11
P. Exu 365	1970	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 374	1970	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 377	1970	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 430	1971	Araripe-PE	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 617	1974	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 715	1974	Araripe-PE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 718	1974	Araripe-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 720	1974	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 738	1975	Araripe-PE	Humano	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 787	1976	Araripe-PE	<i>Polygenis bolhsi jordani</i>	a1-a8 + a94	b1-b5	c1-c3	P12
P. Exu 845	1980	Araripe-PE	Humano	a1-a8	b1-b5+b50	c1-c3	P17
P. Exu 791	1978	Triunfo-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 798	1978	Triunfo-PE	<i>Necromys lasiurus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 822	1979	Triunfo-PE	<i>Oryzomys subflavus</i>	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1
P. Exu 799	1978	s/i-BA	Roedor (s/i)	a1-a8	b1-b5	c1-c3	P1

s/i - Sem informação; * cepas isoladas durante epizootia; ♦ cepas isoladas durante surto ; 1s - primeiro subcultivo; 2s - segundo subcultivo.

TABELA II

Novos espaçadores identificados nas cepas de *Yersinia pestis*

Loco	Espaçador	Sequência	Gene correspondente	Produto	Posição no genoma da CO92
YPa	a89	TTTTGCATTTGGATTCTCCTTGAATGCCTCACT	YPO2125	Proteína regulatória de fago	2394002...2393971
	a90	CAGCCAGATAGCCGTTTTTCACAGTATTGATA	YPO2108	Proteína hipotética de fago	2379796...2379765
	a91	AGATCATGGGGCCGAGTTAGAACATCAAACAT	-	rRNA-23S	16489...16458
	a92	ATAGGCATAGCACCAGGCGGCGGAAAACAG	YPO3683	Regulador transcricional	4118222...4118253
	a93	AGGTGCAACAGGGACTTTAGGATAGAAAAGTC	-	PLDc_Ymt_2(domínio catalítico da fosfolipase D)	76012 -75980
	a94	ACTTAGGGACATTAGCTTGGGATGTGAAACAG	YPO3681	Regulador transcricional	4116449...4116480
	a95	GTGTGGGTTTCGACATCCAACAACGCAAAT	YPO3722	Metionina sintetase	4163317...4163348
	a96	AAGCTAAAGGCCCGCCGTTTGTGGTGGTACCA	-	Região plasmidial pMT1	72933...72902
	a97	ATGTAGTTCCTCGTGGAACCTGTCCATCCATA	YPO2108	Proteína hipotética de fago	2380231... 2380200
	a98	CCTTTCCAGTAGAGCTGAACCATCTTTATCA	YPO2109	Proteína hipotética de fago	2381102...2381071
	a99	GTTTGCTACCATCACCGCCAGTAGTGTATCCC	YPO1270	Proteína transportadora ABC	1428320...1428289
	a100	CTTGACCCTCAAATTGAGTGTAAGGGGTTTGG	YPO2093	Proteína de fago	2369531...2369563
	a101	GGTAAGCTCTGCATTTAACGCTGTTTCGACGG	YPO1561	Transposase	1695043...1695074
	a102	TGTTTCCACGTTGCAATTTTTCAACATGCTTA	-	Região plasmidial pCD1	7511...7480
	a103	ATTGATGACTAGAATACACTAGTAAGTAATAAC	-	PLDc_Ymt_2 (domínio catalítico da fosfolipase D)	76206...76237
YPb	b50	TGCGCCATTGGCGTTGGTTTTTCAGGTATTCCAG	YPO2103~YPO2106	Proteína hipotética de fago	2378226...2378195
	b51	GAAAGAATAAGGATTATAATTTATGACCACA	YPO2109~YPO2110	Proteína hipotética de fago	2381302... 2381333
	b52	ACCAAGCGGAAGTGCCTCAAAGCACCGGTTA	YPO2103	Terminase putativa de fago	2375623 ... 2375592
	b53	GTGGCGATAAACTTAAGCTGGGTCAAGATTAT	YPO2095~YPO2096	Proteína hipotética de fago	2370526... 2370557

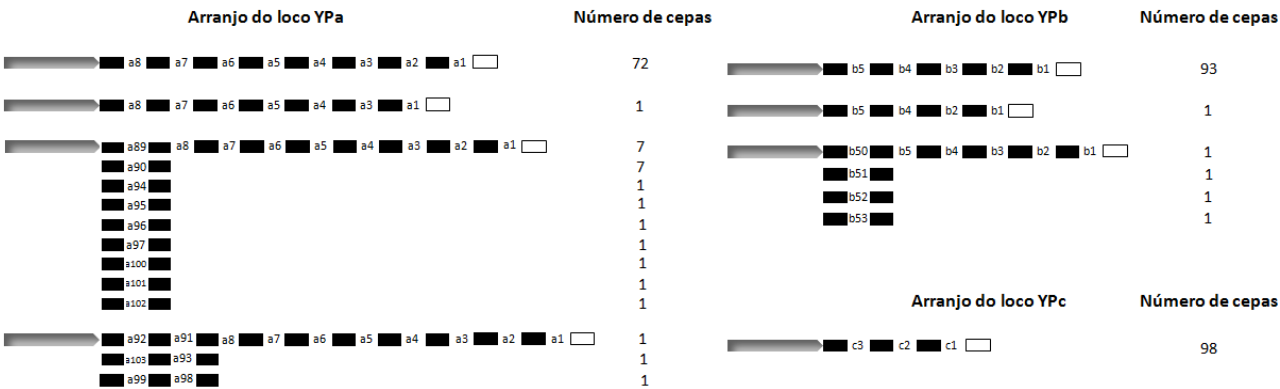


Fig 1: Variabilidade estrutural dos locos CRISPR nas cepas de *Yersinia pestis* analisadas. Sequência Líder em cinza, DRA em preto, e DR degenerada em branco.

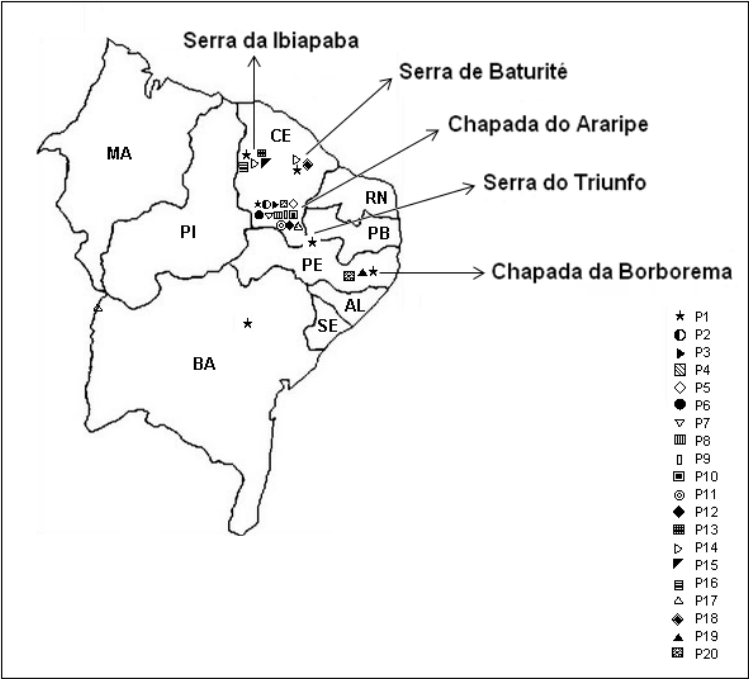


Fig 2: Distribuição geográfica dos perfis genotípicos identificados nas cepas de *Yersinia pestis* analisadas.

3. CONCLUSÃO

As análises dos três locos CRISPR da *Y. pestis* (YPa, YPb, YPc) em cepas representativas dos focos pestosos do Nordeste do Brasil, obtidas de diferentes fontes no período de 1966 a 1997, contribuíram para o aumento dos conhecimentos sobre a estrutura das populações e a microevolução da bactéria após sua entrada e focalização no país. As características genéticas observadas nas cepas analisadas e a distribuição temporal e geográfica dos perfis genotípicos identificados confirmam a introdução de um único clone da bactéria no país. Novas características genéticas, exclusivas nas cepas brasileiras, foram evidenciadas possibilitando estabelecer uma correlação entre as cepas e os focos de origem. A diversidade intraespecífica observada entre as cepas pode ser atribuída a microevolução da bactéria em resposta as exposições a fagos e outros elementos de DNA exógeno sofridas ao longo do tempo nos diferentes ambientes nos diversos focos.

ANEXO I



Instruções aos Autores

As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, para não causar atrasos na publicação sugerimos que sejam checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço:<http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

Por meio desse serviço você pode submeter o artigo e acompanhar o status do mesmo durante todo o processo editorial. Garantindo rapidez e seguranças na submissão do seu manuscrito e agilizando o processo de avaliação.

O manuscrito deverá ser preparado de acordo com as **Orientações aos Autores**.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2562.1222), fax (+55-21-2562-1220), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Orientações aos Autores

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidos juntos em arquivo único. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O manuscrito deve ser apresentado na seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser

citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

• **No texto, usar o sobrenome do autor e a data:**

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

• **Nas referências, usar os seguintes estilos:**

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Livro ou Tese

Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET**Acesso aberto:**

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

Ilustrações: figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- **Figuras:** as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- **Tabelas:** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

• **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

• **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

• uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.

• uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.

• **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação.

• **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

ANEXO II

Artigo de divulgação publicado na *Ciência Hoje* (Revista de divulgação científica da SBPC)





PESTE:

CAMILA TENORIO FRANÇA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, e Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

MARIA PALOMA SILVA DE BARROS

Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, e Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

TEREZA CRISTINA LEAL BALBINO

Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

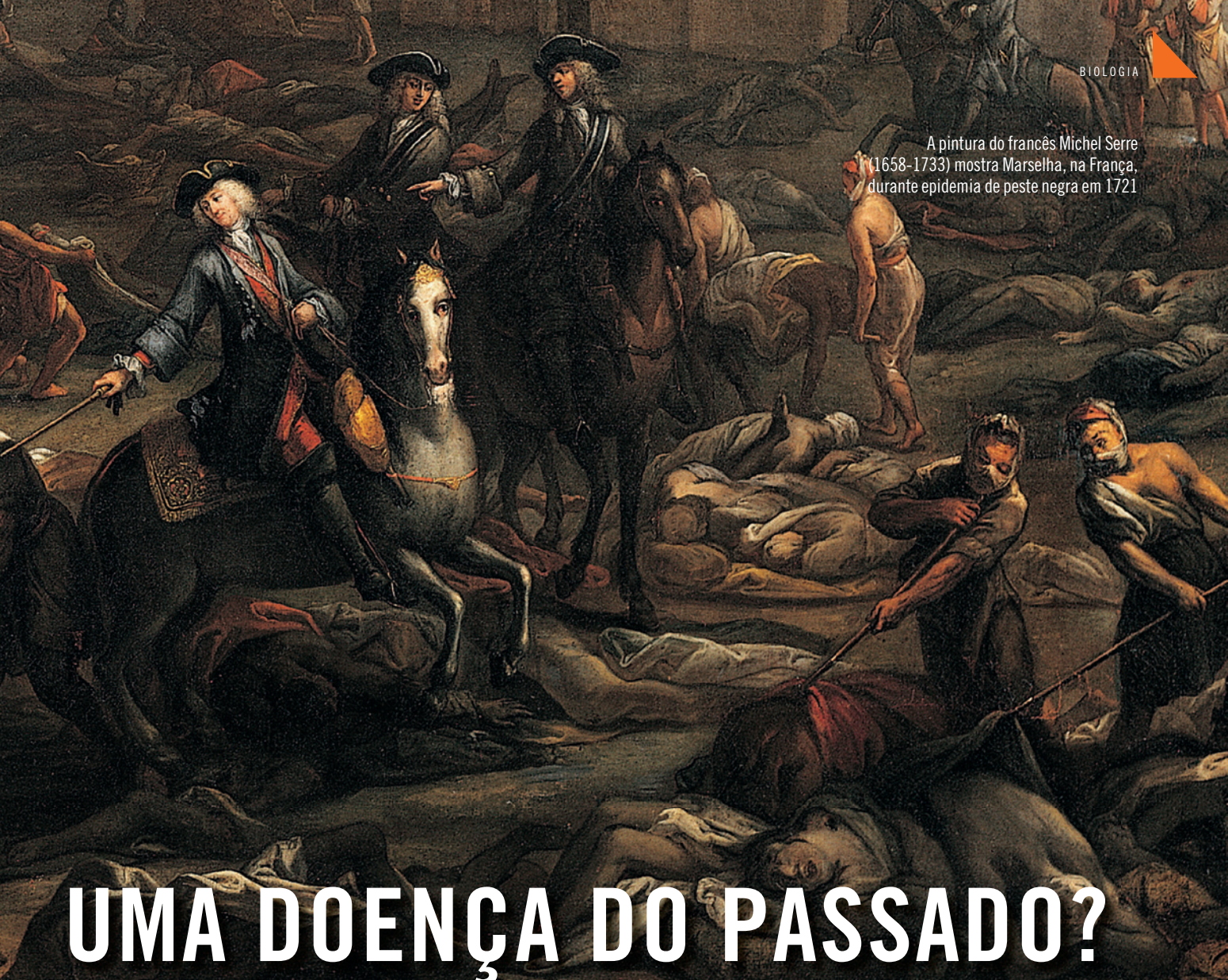
ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA

Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, e Serviço de Referência Nacional em Peste

MARIA BETÂNIA MELO DE OLIVEIRA

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

A peste, doença conhecida desde tempos remotos e uma das mais temidas pela humanidade, ainda oferece perigo nos dias atuais. A análise das ocorrências mais recentes dessa enfermidade mostra que pode reaparecer após longos períodos sem novos casos e que a incidência vem crescendo em vários países. No Brasil, embora o último registro conhecido seja de 2005, o Serviço de Referência Nacional em Peste (SRP), sediado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, unidade regional da Fundação Oswaldo Cruz em Pernambuco (Fiocruz/PE), vem buscando novos conhecimentos e tecnologias para aperfeiçoar os sistemas de vigilância e de controle epidemiológico, para evitar que a bactéria, ainda encontrada em roedores silvestres em algumas áreas do país, atinja a população humana.



A pintura do francês Michel Serre (1658-1733) mostra Marselha, na França, durante epidemia de peste negra em 1721

UMA DOENÇA DO PASSADO?

Nenhuma outra doença teve tanto impacto na vida das populações humanas quanto a peste. Responsável pela morte de mais de 200 milhões de pessoas, ao longo dos últimos milênios, alterou tragicamente – em diferentes épocas – a ordem social e econômica e o próprio curso da história. Considerada por muitos um castigo divino, ela atingiu indiscriminadamente campos, cidades, pobres, ricos, homens, mulheres, adultos e crianças, deixando marcas no imaginário humano que se refletem em vários aspectos das artes, como na pintura, literatura, poesia, teatro e cinema.

Originária do planalto central da Ásia, a enfermidade causou, apenas durante a era cristã, três pandemias. A primeira, denominada ‘Peste de Justiniano’, afligiu o norte da África, a Europa e o centro-sul da Ásia entre os anos 542 e 602, causando elevada mortalidade e contribuindo para o declínio do Império Romano. A segunda, conhecida como ‘Peste Negra’, surgiu na forma pneumônica (a mais letal) e estendeu-se do século 14 ao 16, exterminando um terço da população europeia apenas entre os anos 1347 a 1353.

>>>

Figura 1. O suíço-francês Alexander Yersin (1863-1943) descobriu a bactéria causadora da peste, hoje batizada em sua homenagem: *Yersinia pestis*

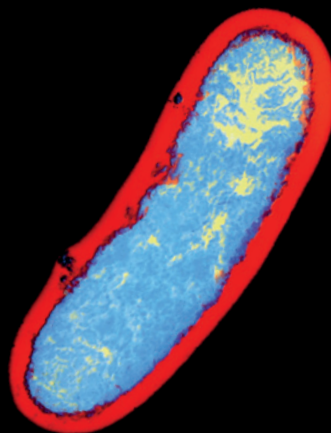


Figura 2. Bacilo *Yersinia pestis*

A terceira, chamada de ‘Pandemia Contemporânea’, teve início na China, em 1855, e pode ser considerada a única de fato pandêmica: graças ao desenvolvimento do transporte marítimo, com a substituição de embarcações a vela pelos navios a vapor, em menos de 50 anos a epidemia se espalhou, atingindo locais até então livres da doença, criando focos naturais em todos os continentes habitados, exceto a Oceania.

Embora alguns considerem que essa terceira pandemia ainda está em curso, sua expansão diminuiu bastante após a Segunda Guerra Mundial, quando os antigos navios, infestados de roedores e pulgas, foram afundados e substituídos por modelos modernos, em geral à prova de ratos. A adoção de medidas eficazes de saúde pública (graças aos conhecimentos científicos adquiridos sobre a bactéria, seus hospedeiros e vetores), o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos, o uso de inseticidas e o controle mais eficiente das populações de roedores possibilitaram que o número de vítimas dessa pandemia fosse significativamente menor que o das anteriores.

A bactéria e a doença Foi durante a terceira pandemia que, em junho de 1894, o pesquisador suíço naturalizado francês Alexander Yersin (1863-1943) (figura 1) isolou pela primeira vez a bactéria causadora da peste, em cadáveres e em ratos comuns (*Rattus rattus*). O micro-organismo recebeu o nome *Yersinia pestis* em sua homenagem. Essa bactéria tem a forma de bacilo, curto e ovoide (figura 2).

A peste, em essência uma doença de roedores, é transmitida principalmente por meio da picada de pulgas infectadas com a bactéria. Das quase 2 mil espécies de roedores identificados, cerca de 230 – dos gêneros *Rattus*, *Cerradomys* (*Oryzomys*), *Galea*, *Trychomys*, *Olgoryzomys*, *Calomys* e outros – abrigam naturalmente a *Y. pestis*, que já foi encontrada em mais de 200 das mais de 3 mil espécies de pulgas. Nos focos ainda existentes no Nordeste brasileiro, destaca-se um roedor nativo, o pixuna ou ratinho-do-cerrado (*Necromys lasiurus*), por

viver perto de habitações humanas a apresentar grande densidade populacional e suscetibilidade à doença. Entre as pulgas, as espécies *Xenopsylla cheopis*, *Polygenis bohlsi jordani* e *Polygenis trypus* (que parasitam ratos) são as principais transmissoras da doença.

Cães, gatos, coelhos, caprinos e camelos também podem ser hospedeiros da *Y. pestis*. Apesar da sobrevivência da bactéria em populações animais de muitos locais do mundo, a ocorrência, hoje, de casos humanos é considerada acidental e deve-se principalmente a atividades – como agricultura ou lazer (acampar, caçar, pescar e outras) – que levam pessoas a ecossistemas rurais e campestres, onde vivem roedores que podem estar infectados. Outra possibilidade é a introdução de roedores e pulgas infectadas em ambientes habitados por humanos. A transmissão de pessoa a pessoa é mais rara, mas também pode ocorrer, em geral por via aérea (por gotículas com a bactéria expelidas na tosse ou no espirro).

Clinicamente, a peste humana apresenta três formas principais. A bubônica, mais comum, tem como principal característica a formação de um bubão (inchaço do nódulo linfático) próximo ao local da picada da pulga. Já a peste septicêmica, mais rara, é caracterizada pela presença da bactéria no sangue e por manchas na pele e hemorragias nas extremidades dos membros. A forma pneumônica, considerada a mais grave, tem desenvolvimento rápido, grande letalidade e alto potencial de contágio, e pode causar epidemias por ser mais facilmente transmitida entre as pessoas, na tosse ou no espirro. Em qualquer das três formas, a doença é fatal sem pronto tratamento.

A peste também tem importância como doença ocupacional, já que profissionais de saúde, biólogos e veterinários atuais geralmente não a consideram perigosa e estão expostos ao risco de infecção no exercício de suas atividades, sejam estas exercidas em áreas consideradas focos potenciais da doença ou em locais isentos (nesse caso, no contato com tecidos e fluidos de pessoas doentes ou com tecidos de animais infectados).

Casos de infecção e morte de biólogos e caçadores têm sido relatados nos Estados Unidos, devido ao manuseio de animais silvestres, como lincos, puma, coelhos e lebres infectados por *Y. pestis*. Animais domésticos, como gatos, cães, porquinhos-da índia e outros, também podem ser infestados por pulgas infectadas, o que exporia seus proprietários e veterinários a situações de alto risco. O consumo da carne de roedores e outros animais, como preás, mocós, punarés, lebres, coelhos silvestres e camelos, comum em algumas regiões (inclusive no Brasil), também é um fator de risco (figura 3).

É importante salientar que, devido ao potencial de causar doença grave e de se disseminar na população humana, a *Y. pestis* é classificada na classe 3 de risco

biológico (em escala crescente de 1 a 4), e sua manipulação exige laboratórios com nível de biossegurança 3. Estes devem ter instalações especiais (com barreiras de contenção e normas de conduta para evitar a saída de qualquer material contaminado), equipamentos de proteção individual e de desinfecção para os pesquisadores (que devem receber treinamento específico), e rígido controle de todos os procedimentos e da manutenção.

A epidemia no Brasil A peste chegou ao Brasil em outubro de 1899, pelo porto de Santos (SP), no navio Zeyer, que chegou da Holanda com um carregamento de trigo e com ratos e pulgas infectados. A infecção atingiu de início as cidades litorâneas, na chamada fase por- >>>

CICLO EPIDEMIOLÓGICO DA PESTE

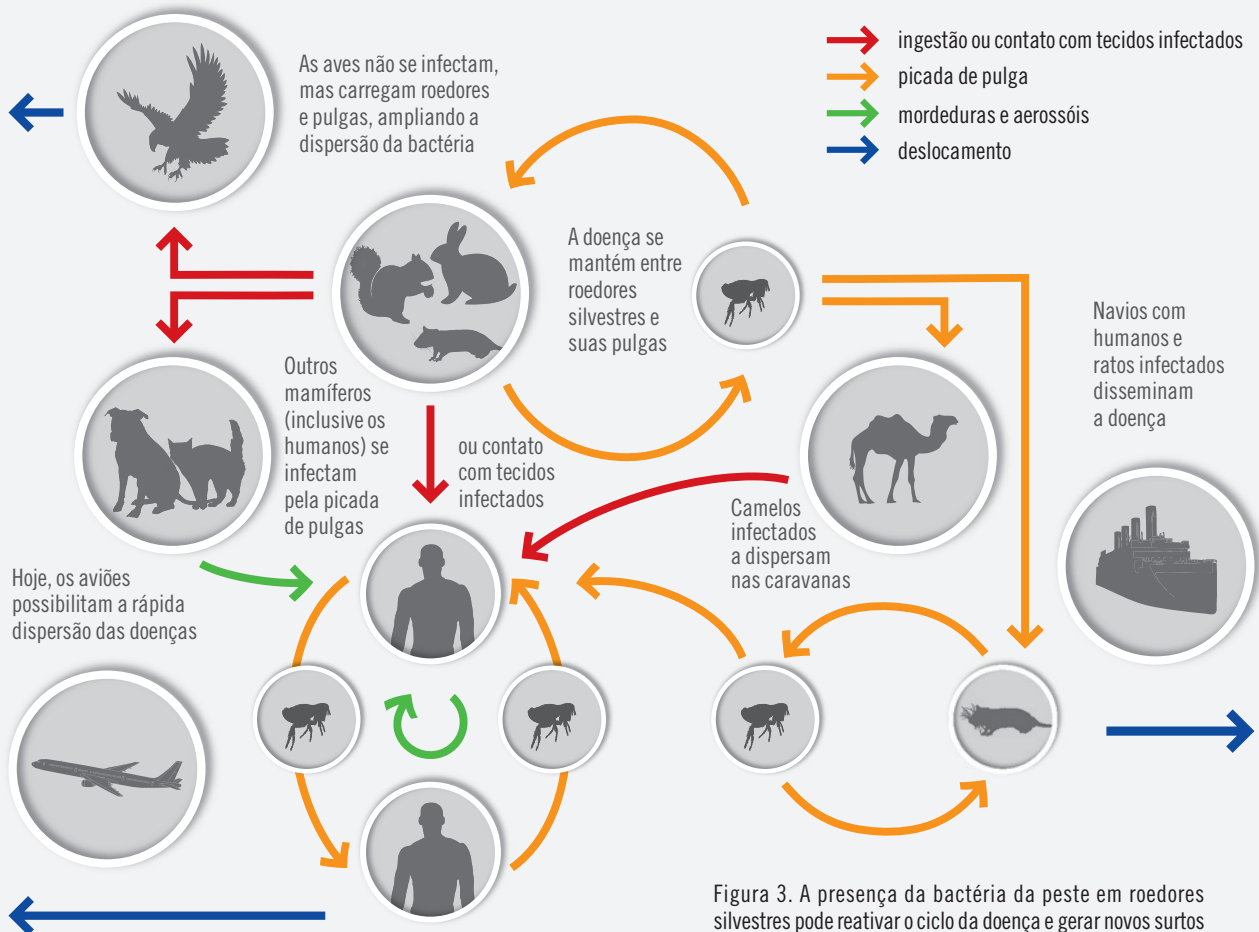
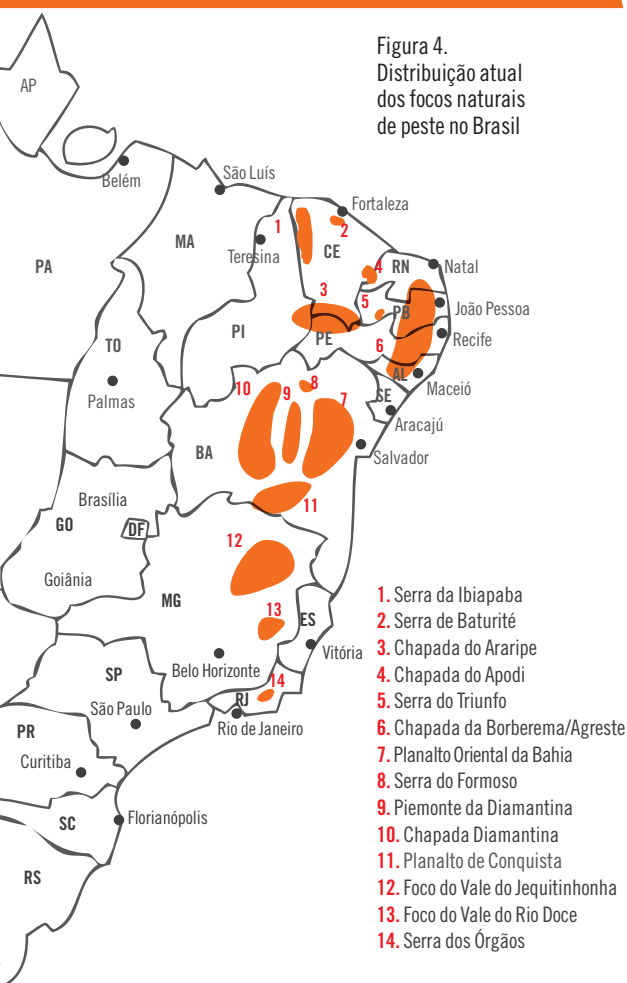


Figura 3. A presença da bactéria da peste em roedores silvestres pode reativar o ciclo da doença e gerar novos surtos



ÁREAS DE FOCOS DE PESTE

tuária da doença. A partir de 1907, começou a fase urbana, quando a peste, por ferrovias e rodovias, chegou ao interior do país, atingindo não apenas as maiores cidades, mas também vilas e povoados.

Assim que os primeiros casos humanos foram detectados, o interesse sobre o estudo da peste despertou, motivando a ida para Santos dos famosos pesquisadores Vital Brazil (1865-1950), Adolfo Lutz (1855-1940), Emílio Ribas (1862-1925) e Oswaldo Cruz (1872-1917), para investigar a doença. Os esforços para a produção de soros e vacinas contra a peste deram origem a dois institutos, um em 1899, na fazenda Butantan, em São Paulo (o atual Instituto Butantan), e outro em 1900, na fazenda Manguinhos, no Rio de Janeiro (a atual Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz). Hoje, são dois dos mais importantes centros de pesquisas da América Latina e desenvolvem pesquisas nas mais diversas áreas da saúde.

As campanhas de prevenção promovidas pelo governo federal e os avanços dos sistemas de saúde pública

e saneamento eliminaram a peste das áreas portuárias e urbanas do país, mas não impediram que chegasse a fazendas e sítios (fase rural). A bactéria infectou roedores silvestres, criando diversos focos naturais, ainda existentes: do Ceará ao norte de Minas Gerais e na Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro (figura 4).

A luta contra a peste no Brasil coube, inicialmente, aos departamentos estaduais que cuidavam da Saúde, e com o passar do tempo foi assumida por diferentes órgãos federais – Departamento Nacional de Saúde (DNS), Serviço Nacional de Peste (SNP), Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu), Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (Sucam) e Fundação Nacional da Saúde (FNS). Com a implantação do Sistema Único de Saúde (SUS), o controle da doença passou para o âmbito municipal, com a participação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS).

O número de casos de peste humana no Brasil, que desde a chegada da doença variava de 30 a mais de 500 por ano, declinou na década de 1950 para cerca de 20 a 100 casos anuais. Um novo aumento de casos, na década de 1960, principalmente no Ceará, em Pernambuco e na Bahia, levou o governo federal, com apoio da Organização Mundial de Saúde (OMS), a elaborar e executar, de 1966 a 1974, o projeto ‘Plano Piloto de Peste em Exu’, para investigar a presença da *Y. pestis* em roedores silvestres e estudar as causas da perpetuação dos focos, visando adotar medidas eficazes de controle. O projeto permitiu isolar mais de 600 cepas da bactéria e deu origem à maior coleção de *Yersinia pestis* do Brasil, hoje abrigada na Fiocruz/PE.

As campanhas de estudo da peste contribuíram, ainda, para tornar a coleção de mamíferos do setor de Mastozoologia do Museu Nacional (vinculado à Universidade Federal do Rio de Janeiro) uma das 11 maiores do Ocidente, com mais de 90 mil espécimes. Os serviços de pesquisa sobre a febre amarela e sobre a peste, entre as décadas de 1930 e 1950, contribuíram com considerável parcela dessa coleção – apenas o Serviço Nacional da Peste obteve 55.291 exemplares de pequenos mamíferos não voadores. Vale ressaltar o trabalho do professor João Moojen de Oliveira (1904-1985) na coleta e organização dessas coleções.

Pequenos surtos de peste ainda ocorriam no Brasil até 1980. A partir daí foram registrados apenas casos esporádicos – os últimos no Ceará, em 1997 e 2005. Hoje, embora não haja casos humanos, as atividades de vigilância sorológica nas áreas focais continuam a detectar anticorpos contra a *Y. pestis* em animais sentinelas (cães e gatos domésticos, predadores dos roedores), sugerindo que a bactéria ainda circula na natureza e que os focos permanecem ativos. Ocasionalmente, são realizadas pesquisas de detecção de anticorpos e da própria bactéria em vísceras de roedores e pulgas. Também é mantida vigilância em portos e aeroportos.

A Fiocruz/PE sedia hoje o Serviço de Referência Nacional em Peste (SRP), oficializado em 2002 por portaria do Ministério da Saúde. Esse serviço tem como atribuições desenvolver pesquisas científicas, produzir e distribuir insumos usados no diagnóstico da doença, capacitar profissionais e supervisionar a atividade dos programas de controle da peste nas áreas focais. Estudos feitos no centro têm permitido conhecer me-

lhor as características das cepas brasileiras de *Y. pestis* e confirmar sua história natural. Análises de regiões específicas do DNA da bactéria têm gerado informações relevantes sobre sua diversidade, e a junção desse conhecimento com dados epidemiológicos tem contribuído, por exemplo, para a compreensão de como a peste se dispersou pelo país e de como é transmitida na natureza.

Realidade e perspectivas A peste é considerada uma doença reemergente pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com aparente tendência de aumento do número de casos e de dispersão geográfica, e pode gerar uma situação de emergência internacional. O Regulamento Sanitário Internacional (RSI), acordo firmado por quase 200 países para prevenir a propagação de doenças, determina a manutenção de serviços de vigilância contra doenças que podem causar epidemias (entre elas a peste pneumônica) e a notificação imediata da OMS sobre a ocorrência de surtos dessas doenças.

Nos últimos 20 anos, cerca de 44 mil casos humanos de peste foram registrados em 26 países, na África (República do Congo, Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia), na Ásia (China, Vietnã, Mongólia e Cazaquistão) e nas Américas (Estados Unidos, Peru, Equador e Bolívia). Por ano, ocorrem de mil a 3 mil casos. Esses números, porém, são considerados subestimativas da real situação, devido à ausência de vigilância adequada em muitas áreas e à falta de notificações, por medo do impacto que a doença pode ter na economia das regiões onde ocorre (figura 5).

Em 1994, por exemplo, um surto de peste pneumônica na cidade de Surat, na Índia, causou pânico e fuga da população, com perdas de US\$ 3 bilhões por restrições nas exportações e redução do turismo. Já na cidade de Ziketan, na China, em 2009, 10 mil habitantes foram submetidos a quarentena. A peste também continua presente em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde são registrados de 10 a 15 casos por ano, segundo o Centro de Controle de Doenças do país.

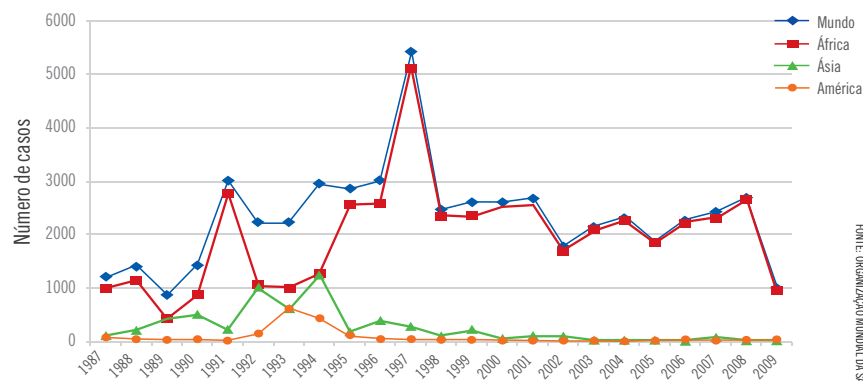


Figura 5. Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009 no mundo

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010

A ocorrência de períodos sem casos humanos (ou com raros registros) é comum, e pode sugerir que a doença foi erradicada. A peste, no entanto, tende a reaparecer após décadas de aparente controle e seu potencial epidêmico é ainda maior, hoje, devido aos rápidos deslocamentos possibilitados pelos modernos meios de transporte, o que facilita a propagação. A *Y. pestis* também pode ser usada como arma biológica, em ataques terroristas, o que levou à inclusão dessa bactéria entre os agentes de bioterrorismo considerados mais perigosos.

A peste, se diagnosticada a tempo, tem tratamento, com medicamentos antimicrobianos – gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas e sulfonamidas. O aumento de casos humanos no mundo, e seu possível uso como arma biológica têm levado pesquisadores (inclusive na Fiocruz/PE) a buscar métodos de diagnóstico mais sensíveis, rápidos e seguros, para aplicação na vigilância de rotina e em emergências.

A importância histórica, social e econômica da peste justifica todos os esforços e investimentos para manter uma vigilância contínua. A população e os profissionais de saúde devem estar atentos à existência e à gravidade da doença, aos aspectos epidemiológicos e à prevenção, adotando atitudes que evitem a ocorrência de surtos e a propagação da bactéria. 

Sugestões para leitura

- ALMEIDA, A. M. P. e TAVARES, C. 'Peste' (v. 1, p. 1.187), em VERONESI, R. e FOCCACIA, R., *Tratado de infectologia*, São Paulo, Atheneu, 2010.
- FREITAS, C. A. *Histórias da peste e outras endemias*. Rio de Janeiro, PEC/Escola Nacional de Saúde Pública, 1988.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da peste*. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.
- STENSETH, N. S.; ATSHABAR, B.; BEGON, M. e outros. 'Plague: past, present and future', em *Public Library of Science (PLOS) Medicine (on-line)*, 5(21), e3, doi:10.1371/journal.pmed.0050003.