

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

Maria Paloma Silva de Barros

Caracterização Genética de cepas de *Yersinia pestis*

Recife
2012

Maria Paloma Silva de Barros

Caracterização Genética de cepas de *Yersinia pestis*

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

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Co-Orientadora: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Recife

2012

Catálogo na Fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barros, Maria Paloma Silva de

Caracterização genética de cepas de *Yersinia pestis*/ Maria Paloma Silva de Barros– Recife: O Autor, 2012.

131 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Albino

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2012.

Inclui bibliografia, anexo

1. Genética bacteriana 2. *Yersinia pestis* 3. Peste I. Albino, Tereza Cristina Leal (orientadora) II. Oliveria, Maria Betânia Melo de (coorientadora) III. Título

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 250

Maria Paloma Silva de Barros

Caracterização Genética de cepas de *Yersinia Pestis*

Aprovado em 14 / 09 / 2012

Banca Examinadora:

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

**Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ)**

**Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ)**

**Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

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

Recife

2012

Dedico este trabalho a minha mãe.
Mesmo não presente para entregar
uma cópia, sei que sempre esteve
e estará ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas orientadoras, Dra. Tereza Cristina e Dra. Maria Betânia, que me acompanham desde o Mestrado e que juntas desenvolvemos um grande trabalho. Obrigada pelo apoio, pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos.

Agradeço por conviver e aprender com as pesquisadoras Dra. Nilma Leal e Dra. Alzira Almeida.

Aos meus grandes amigos e parceiros, Carina Mendes, Felipe Lira, Mari Andrade, Rosanny Holanda e Vladimir Filho, agradeço com toda minha força. Vocês foram essenciais e indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho. Serei, eternamente, grata e lisonjeada por ter tido a oportunidade de tê-los ao meu lado.

Agradeço a Camila Tenorio e Milena Danda pela amizade, pela ajuda e pela sempre presença no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos estagiários, técnicos e colegas do Departamento de Microbiologia, CPqAM/FIOCRUZ, por me ajudarem, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Agradeço aos envolvidos no laboratório NB3 pela preocupação e auxílio na manutenção dos equipamentos para desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a Msc. Viviane Carvalho e Dra. Cássia Docena, do Núcleo de Plataformas Tecnológicas, CPqAM/FIOCRUZ, pela ajuda no processamento das sequências de DNA.

Agradeço a banca avaliadora pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Agradeço ao meu marido, Walberto Montarroyos, por sempre está ao meu lado, caminhando junto comigo, acreditando e confiando em mim.

Agradeço a Força Divina que me mantém viva e esperançosa. É dela que veio a minha coragem de prosseguir, mesmo quando tudo parecia impossível.

"A grande mortandade teve início em Avignon em janeiro de 1348. A epidemia se apresentou de duas maneiras. Nos primeiros dois meses manifestava-se com febre e expectoração sanguinolenta e os doentes morriam em 3 dias; decorrido esse tempo manifestou-se com febre contínua e inchação nas axilas e nas virilhas e os doentes morriam em 5 dias. Era tão contagiosa que se propagava rapidamente de uma pessoa a outra; o pai não ia ver seu filho nem o filho a seu pai; a caridade desaparecera por completo. Não se sabia qual a causa desta grande mortandade. Em alguns lugares, pensava-se que os judeus haviam envenenado o mundo e por isso os mataram".

Guy de Chauillac - médico cirurgião. França,
sec XIV

RESUMO

A peste é uma doença que permanece enraizada em inúmeros focos naturais por todo o mundo. Embora o Brasil passe por um período de silenciamento epidemiológico, anticorpos antipestosos são detectados nas atividades de vigilância, sugerindo que estes focos permanecem ativos. A *Yersinia pestis*, agente causador da peste, apresenta uma história evolutiva recente e é considerada uma espécie, geneticamente, muito homogênea. Diante da necessidade de estudos mais aprofundados sobre as características moleculares e evolutivas dos isolados de *Y. pestis* dos focos do Brasil, realizamos neste trabalho uma caracterização de cepas da coleção biológica (Fiocruz-CYP) de *Yersinia*, provenientes de cinco focos de peste do Brasil, com a finalidade de compreender a adaptação da bactéria no ambiente. Realizamos a padronização e a análise de macrorestrição (PFGE) em 22 cepas de *Y. pestis*, 17 de um surto ocorrido em 1986 e cinco isoladas da atividade de vigilância. O PFGE não separou os isolados da rotina e do surto, entretanto foi capaz de revelar diversidade genética entre as cepas. As técnicas MLVA e CRISPR também foram utilizadas na genotipagem das cepas de *Y. pestis*. Doze locos VNTR (MLVA) analisados em 37 cepas, pertencentes a dois eventos epidemiológicos distintos, permitiram observar a separação dos grupos por evento e estabelecer uma relação epidemiológica. Três locos CRISPR (YPa, YPb e YPc) foram analisados em 146 cepas, apenas dois (YPa e YPb) se mostraram polimórficos. A análise desta região permitiu realizar uma caracterização intraespecífica e microevolutiva dos isolados de peste dos focos brasileiros. O MLVA e o CRISPR demonstraram uma melhor relação entre os dados epidemiológicos e moleculares, enquanto o PFGE apenas diferenciou os isolados de *Y. pestis*. Os dados gerados pelas três técnicas estudadas permitiram confirmar que houve apenas a entrada de um clone de *Y. pestis* no Brasil e observar que alguns processos adaptativos foram necessários para sua interiorização e fixação nos focos do país.

Palavras-chave: PFGE; MLVA; CRISPR; caracterização molecular; microevolução; *Yersinia pestis*.

ABSTRACT

Plague disease remains present in numerous natural foci worldwide. Although Brazil goes through a period of epidemiological silence antiplague antibodies are detected in the surveillance activities, suggesting that Brazilian foci remain active. *Yersinia pestis*, causative agent of plague, has a recent evolutionary history and is considered a very genetically homogeneous species. Given the need for further studies on the molecular and evolutionary characteristics of the isolates of *Y. pestis* of the Brazilian plague areas, we perform in this work a characterization of strains biological collection (Fiocruz-CYP) of *Yersinia*, from five outbreaks of plague in Brazil, with the aim of understanding the adaptation of bacteria to the environment. We carried out the standardization and macrorestriction analysis (PFGE) in 22 *Y. pestis* strains, 17 from an outbreak occurred in 1986 and five from surveillance activity. PFGE did not separate the isolates from surveillance and from outbreak, but it was able to reveal genetic diversity among strains. MLVA and CRISPR techniques were also used in genotyping *Y. pestis* strains. Analysis of 12 VNTR loci (MLVA) in 37 *Y. pestis* strains, of two different epidemiological events, allowed observing the separation of groups establish an epidemiological link among the isolates. Three CRISPR loci (YPa, YPb and YPc) were analyzed in 146 *Y. pestis* strains, only two loci (YPa and YPb) were polymorphic. The analysis of this region allowed an intraspecific characterization and microevolutionary of the plague isolates in the Brazilian foci. The CRISPR and MLVA showed a better relationship between the epidemiological and molecular data, while PFGE differ only the *Y. pestis* strains. The data generated by the three techniques studied confirmed that there was only one entry clone *Y. pestis* in Brazil and observed that some adaptive processes were necessary for its internalization and fixation of these foci in our country.

Key words: PFGE; MLVA; CRISPR; molecular characterization; microevolution; *Yersinia pestis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Figura 1 - Dispersão das pandemias de peste de acordo com os registros históricos.	5
Figura 2 - <i>Yersinia pestis</i> visualizada em microscopia óptica e eletrônica.	7
Figura 3 - Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009.	10
Figura 4 - Casos de peste humana registrados no Brasil.	11
Figura 5 - Distribuição mundial da peste em diferentes focos.	12
Figura 6 - Principais focos da peste no Brasil.	13
Figura 7 - Ciclo bioecológico da peste.	16
Figura 8 - As três principais formas clínicas da peste.	17
Figura 9 - Representação do genoma de <i>Yersinia pestis</i> .	22
Figura 10 - Caracterização do crescimento de cepas de <i>Yersinia pestis</i> crescidas em meio Agar Vermelho Congo.	23
Figura 11 - Representação esquemática de um loco VNTR.	26
Figura 12 - Representação esquemática do loco CRISPR.	27
Figura 13 - Representação esquemática dos três tipos de sistema CRISPR/Cas.	28
Figura 14 - Esquema do mecanismo de defesa baseado no sistema CRISPR/Cas.	30
Figura 15 - Figura esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no genoma de cepas de <i>Yersinia pestis</i> .	31

LISTA DE ABREVIações

Item	Definição
BAB	(<i>Blood Agar Base</i>) Base para Agar Sangue
BHI	(<i>Brain Heart Infusion</i>) Infusão de Cérebro e Coração
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRISPR	(<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>) Grupo de Repetição Palindrômica Curta e Regularmente Interespaçada
DR	(<i>Direct Repeats</i>) Repetição Direta
DG	Repetição Degenerada
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
hms	(<i>hemin storage</i>) Genes de estocagem de hemina
HPI	(<i>high pathogenicity island</i>) Ilha de alta patogenicidade
IS	Sequência de Inserção
MLVA	(<i>multiple locus VNTR analysis</i>) Análise de Múltiplos locos VNTR
MS/SVS	Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde
pb	pares de base
pCD1 ou pYV	Plasmídio das <i>Yersinias</i>
pCP1 ou pPst	Plasmídio de <i>Yersinia pestis</i>
pMT1 ou pFra	Plasmídio de <i>Yersinia pestis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
Pgm-	Colônia negativa no teste de pigmentação (brancas)

Pgm+	Colônia positiva no teste de pigmentação (vermelhas)
<i>pim</i>	(<i>pesticin immunity</i>) Gene de imunidade à pesticina
<i>pla</i>	(<i>plasminogen activator</i>) Gene do ativador do plasminogênio
<i>pst</i>	(<i>pesticin</i>) Gene da pesticina
RAPD	(<i>random amplification polymorphism DNA</i>) Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente
RFLP	(<i>restriction fragment length polymorphism-insertion sequence</i>) Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição
SRP	Serviço Nacional de Referência em Peste
VNTR	(<i>variable number repeat tandem</i>) Número Variável de Repetições em Tandem
<i>ymt</i>	(<i>yersinia murine toxin</i>) Gene da toxina murina de yersínia

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Visão histórica da peste	4
2.2 <i>Yersinia pestis</i> : agente etiológico	6
2.3 Situação global e focos naturais de peste	9
2.4 Epidemiologia: o ciclo de transmissão da peste	13
2.5 Peste: a doença	16
2.6 Diagnóstico Laboratorial	18
2.7 Tratamento	18
2.8 Prevenção e Controle	19
2.9 Visão genômica da <i>Yersinia pestis</i>	21
2.9.1 Cromossomo e Plasmídios	22
2.10 Métodos Moleculares aplicados em estudos de <i>Yersinia pestis</i>	32
2.10.1 RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente)	33
2.10.2 PCR – Ribotipagem	33
2.10.3 RFLP – IS (Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição-Sequências de Inserção)	34
2.10.4 SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)	34

2.10.5 MLVA (Análise dos múltiplos locos VNTR)	35
2.10.6 Análise dos locos CRISPR	36
2.10.7 PFGE	37
2.11 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> versus <i>Yersinia pestis</i>	37
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo Geral	42
4.2 Objetivos Específicos	42
5 CAPÍTULO I	43
6 CAPÍTULO II	81
7 CAPÍTULO III	93
8 CONCLUSÕES	107
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
10 ANEXO	120
11 CURRÍCULO LATTES	127

1 INTRODUÇÃO

Yersinia pestis, identificada pela primeira vez por Alexandre Yersin em 1894, é o agente causador da peste; zoonose primária de roedores, geralmente transmitida de um animal a outro. O homem é infectado, acidentalmente, quando entra em contato com roedores ou outros animais e suas pulgas infectadas.

Erroneamente, a peste é considerada como uma doença já extinta, no entanto ela ainda persiste nos dias atuais entre diversos hospedeiros/reservatórios e em numerosos focos naturais de vários países da África, Ásia e Continente Americano. No Brasil, apesar do silêncio epidemiológico, são detectados anticorpos antipestosos em animais sentinelas durante atividades de vigilância sorológica. Os últimos casos humanos foram registrados em 1997 e 2005 no Estado do Ceará.

As cepas de *Y. pestis* são muito homogêneas, apresentando um sorotipo, um fagotipo e quatro biotipos ou biovars: *Antiqua*, *Medievalis*, *Orientalis* e *Microtus*. Até o momento, este cenário é suportado pela diversidade observada nos biovars *Antiqua* e *Medievalis*. O biovar *Microtus* apresenta em seu genoma a perda de genes e distribuição de pseudogenes, que podem ser responsáveis pela avirulência em humanos.

Estudos genômicos revelaram que os isolados de *Y. pestis* evoluíram da *Y. pseudotuberculosis* entre 1500 a 20000 anos. Estas análises indicam que algumas regiões do genoma da *Y. pseudotuberculosis* estão ausentes na *Y. pestis*, além do aumento no número de sequências de inserção. Os inúmeros

rearranjos cromossomais, juntamente com a inativação e aquisição de outros genes, que ocorreram durante o surgimento da *Y. pestis*, são indicativos do mecanismo que levou a evolução desse patógeno.

Diferentes técnicas moleculares (RAPD, PCR-Ribotipagem, IS-RFLP), importantes para a detecção de rearranjos genômicos, já foram empregadas para identificação e comparação dos isolados de *Y. pestis*. PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) é uma técnica baseada na separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão dos cromossomos com endonucleases de restrição. Este método tem sido aplicado para análise epidemiológica e distinção de isolados clínicos das mais variadas espécies bacterianas.

O MLVA (Análise dos Múltiplos Locos VNTR) é utilizado como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas. Esta técnica detecta polimorfismos, como resultados dos eventos de inserção e deleção dos VNTR nas espécies bacterianas.

Os locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Grupo de Repetição Palindrômica Curta e Regularmente Interespaçada) são constituídos por uma nova família de DNA repetitivo, presente no genoma de muitas bactérias. Esta região é composta por sequências repetidas, separadas por trechos polimórficos de DNA, nomeados de espaçadores. Um conjunto de genes, denominados *cas* (CCRISPR - associados), também está associado ao loco, os quais codificam uma variedade de proteínas: nucleases, polimerases e helicases. A análise destes

locos vem sendo utilizada com sucesso para tipagem e estudos filogenéticos em diferentes gêneros bacterianos.

Neste trabalho, exploramos o uso potencial de três técnicas moleculares para caracterização de cepas de *Y. pestis* de diferentes origens geográficas. Foi possível concluir que as cepas de *Y. pestis*, de cinco focos do Brasil, apresentaram modificações genéticas como forma de adaptação ao ambiente e que houve apenas a entrada de um único clone nos focos de peste do país.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Visão histórica da peste

Embora tenham havido possíveis relatos de casos de peste durante a antiguidade, incluindo o Antigo Testamento (II Livro de Samuel), o primeiro registro ocorreu em Atenas, em 430 a.C., durante a guerra do Peloponeso, dizimando uma população, de aproximadamente, 300 mil pessoas (Almeida *et al.*, 2005).

Três pandemias de peste são, tradicionalmente, descritas durante a Era Cristã. A primeira, denominada de “Peste de Justiniano”, que se iniciou na África e atingiu o continente europeu e asiático (Figura 1). Entre os anos de 558 a 654 d.C., ocorreram constantes epidemias que resultaram em 100 milhões de mortes (Perry and Fetherston, 1997; Prentice and Rahalison, 2007).

Os primeiros casos da segunda pandemia foram registrados na Ásia e se estenderam por toda Europa e Norte da África, e ficou conhecida como Peste Negra (Figura 1). Apenas em quatro anos desta pandemia (1347 a 1351), 40% da população europeia foram dizimadas (Perry and Fetherston, 1997).

Registros históricos consideram que a terceira pandemia ou “Pandemia Contemporânea” iniciou na província de Yunnan na China em 1855. Disseminou-se através do transporte marítimo para outros continentes, criando

focos naturais em diferentes países, assim como no Brasil (Figura 1), que até então permanecia indene (Perry and Fetherston, 1997; Almeida *et al.*, 2007).



Figura 1 - Dispersão das pandemias de peste de acordo com os registros históricos. **A.** Primeira pandemia (542-605 d.C); **B.** Segunda pandemia (século XIV-XVI); **C.** Terceira pandemia (>1894). **Fonte:** Prentice; Rahalison, 2007.

Durante a epidemia de Hong Kong, em Junho de 1894, o bacilo pestoso foi isolado e identificado por Alexander Yersin, seguido pelo reconhecimento do papel do roedor e da pulga na transmissão dessa doença (Perry and Fetherston, 1997; Gage and Kosoy, 2005).

No Brasil, a peste foi introduzida pelo porto de Santos, em 1899, durante a última pandemia. Atingiu várias cidades litorâneas e se difundiu pelo interior, firmando-se na zona rural entre os roedores silvestres (Pollitzer, 1954; Tavares *et al.*, 2012). Estas regiões rurais apresentavam condições climáticas e geográficas adequadas para a sobrevivência do bacilo, como também a presença dos roedores reservatórios (WHO, 1965; Almeida *et al.*, 1985). Embora as campanhas profiláticas promovidas pelo Governo Federal tenham sido eficientes no controle da peste, sua propagação não foi evitada (WHO,

1965; Aragão *et al.*, 2007). Em 1966, um plano de vigilância de peste (Plano Piloto de peste) foi estabelecido no Brasil, a partir do qual, as bases de pesquisas epidemiológicas foram estabelecidas (Tavares *et al.*, 2012).

Registros revelaram que o período de maior incidência de peste no Brasil antecedeu a década de 1970, entrando em declínio logo após este período. Os anos seguintes foram caracterizados por registros de casos esporádicos (Almeida *et al.*, 2005; Saavedra and Dias, 2011).

2.2 *Yersinia pestis*: agente etiológico

O agente causador da peste, *Yersinia pestis*, é uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, cujo gênero engloba 17 espécies que podem ser diferenciadas entre patogênicas (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*) e não-patogênicas (ambientais): *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* e *Y. pekkanenii*. A *Y. ruckeri* é um patógeno de peixes e sua inclusão no gênero *Yersinia* ainda é controversa (Perry and Fetherston 1997; Sulakvelidze, 2000; Sprague *et al.*, 2008; Merhej *et al.*, 2008; Murros-Kontinen *et al.*, 2011a, 2011b).

Y. pseudotuberculosis e *Y. enterocolitica* são diferentes na forma clínica e nos aspectos epidemiológicos da *Y. pestis*. São classificadas como enteropatogênicas e transmitidas através da via orofecal, causando um quadro clínico chamado Yersiniose, que se caracteriza por manifestações intestinais

(Perry and Fetherston, 1997). Estas duas espécies de *Yersinia* são consideradas muito heterogêneas, diferenciando no conteúdo genômico e grau de patogenicidade. Representantes patogênicos destas espécies foram sequenciados para melhor esclarecer o mecanismo de virulência e as causas dos sintomas agudos e condições crônicas dos pacientes (Thomson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011).

Embora *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* sejam diferentes clinicamente e epidemiologicamente, estudos de hibridização indicam que são, geneticamente, muito próximas (Hervé Bercovier *et al.*, 1980; Carniel, 2008). Análise de genes *housekeeping* confirmou o parentesco genético entre as duas espécies (Achtman *et al.*, 1999).

Em microscopia ótica, a *Y. pestis* se apresenta como um bacilo curto e ovóide (0,5-0,8 μm de diâmetro x 1-3 μm de comprimento), com coloração bipolar (mais claros no centro e extremidades escuras) (Figura 2). Por apresentar pleomorfismo celular, a bactéria pode se apresentar em forma anelar, cocóide, bacilos longos espessos ou afilados (Brasil, 2008).



Figura 2 - *Yersinia pestis* visualizada em microscopia ótica (1000x). O bacilo pestoso é corado por azul de metileno (técnica Wright-Giemsa). **Fonte:** CDC.

O bacilo é aeróbio ou anaeróbio facultativo, imóvel e não formador de esporos, crescendo em meios comuns (BHI: *Brain Heart Infusion* e BAB: *Blood Agar Base*), com temperatura ótima de 28 °C e pH entre 7,4 e 7,6. *Y. pestis* não sobrevive 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 (Almeida *et al.*, 2005; Brasil, 2008).

As cepas de *Y. pestis* são bastante homogêneas quando analisadas por métodos fenotípicos. Apresentam apenas um sorotipo ou sorovar, um fagotipo ou fagovar e quatro biotipos ou biovars, caracterizados pela habilidade de fermentar glicerol e arabinose, reduzir nitrato a nitrito (Devignat, 1951; Perry and Fetherston, 1997; Zhou *et al.*, 2004).

Baseado em dados históricos e no conhecimento sobre os focos naturais da peste, Devignat (1953) sugeriu uma associação entre os três biovars clássicos e as cepas responsáveis pelas pandemias de peste, que o levou a propor a seguinte nomenclatura: *Antiqua* (glicerol⁺, nitrato⁺), referente à Pandemia de Justiniano; *Medievalis* (glicerol⁺, nitrato⁻), referente à Peste Negra; e *Orientalis* (glicerol⁻, nitrato⁺), referente à última pandemia.

O quarto biovar, *Microtus*, foi isolado de roedores dos focos da China e classificadas como cepas glicerol⁺, nitrato⁻ e arabinose⁻. No seu genoma, observa-se um plasmídeo específico (pCRY), que codifica um sistema de secreção tipo IV, além de rearranjos genômicos no plasmídeo pMT1 e a presença de pseudogenes (3,5%) (Song *et al.*, 2004). Comparações genômicas

entre os biovares revelaram a presença de um profago (YpfPhi) nos representantes *Antiqua*, *Medievalis* e *Orientalis*, porém ausente na cepa 91001, biovar *Microtus*. Quando este profago é deletado, a transmissão pela pulga não é alterada, mas se observa a diminuição da patogenicidade da cepa (Derbise *et al.*, 2007). A ausência do profago, mutações nos genes de virulência, como *yopM* e *pla*, e distribuição de pseudogenes podem explicar avirulência desse biovar em humanos (Song *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários testes bioquímicos e genéticos foram realizados e, conseqüentemente, novos biovares já foram identificados. Li *et al.* (2009) definiram o biovar *Intermedium*, para cepas raminose+, que infecta roedores e, de forma ocasional, o homem. Um conjunto de cepas atípicas de *Y. pestis*, denominado *Pestoides*, já foi identificado. São classificadas como cepas raminose⁺ e melibiose⁺; e por não possuírem o plasmídio pPst (Garcia *et al.*, 2007).

2.3 Situação global e focos naturais de peste

Apesar dos esforços no combate à peste, essa doença ainda representa um problema de Saúde Pública devido à persistência de focos naturais, a reemergência em alguns países, a possibilidade de rápido deslocamento de infectados e risco de utilização do bacilo como arma biológica (Anisimov *et al.*, 2004; Stenseth, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) notifica 1000-3000 casos de peste humana por ano, incluindo surtos no continente africano, americano e

asiático (Figura 3). Estas notificações são, muitas vezes, subestimadas, devido à omissão no registro e a falha de alguns países em notificar os casos (Carniel, 2008). Em 2009, Bolívia, Brasil e Equador não registraram episódios de peste, enquanto o Peru registrou 128 casos, incluindo duas mortes (WHO, 2010).

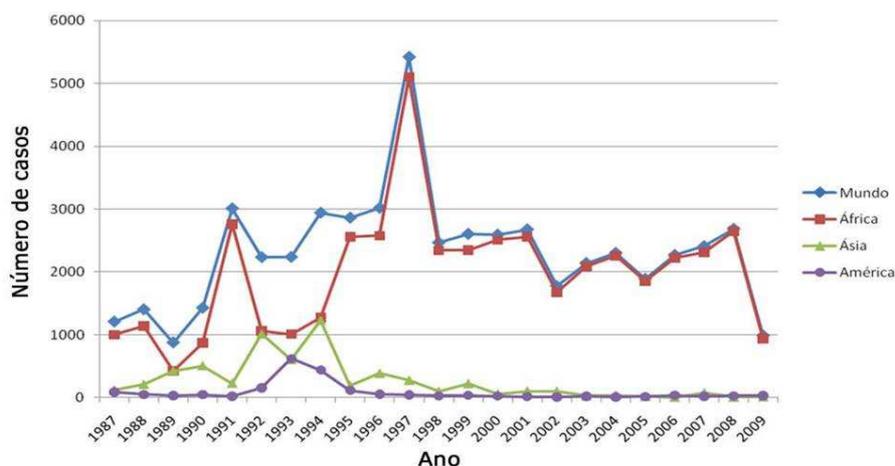


Figura 3 - Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009. **Fonte:** WHO, 2010.

No Brasil, a partir da década de 1950, cerca de 20 a 100 casos de peste humana eram registrados anualmente, principalmente nos estados do Ceará, Pernambuco e Bahia. Pequenas epidemias ainda ocorriam até meados de 1980, quando todos os focos tenderam a quiescência, com ocorrência de raros casos: os últimos em 1997 e 2005 no Ceará (Brasil 2008; Almeida and Tavares, 2010) (Figura 4).

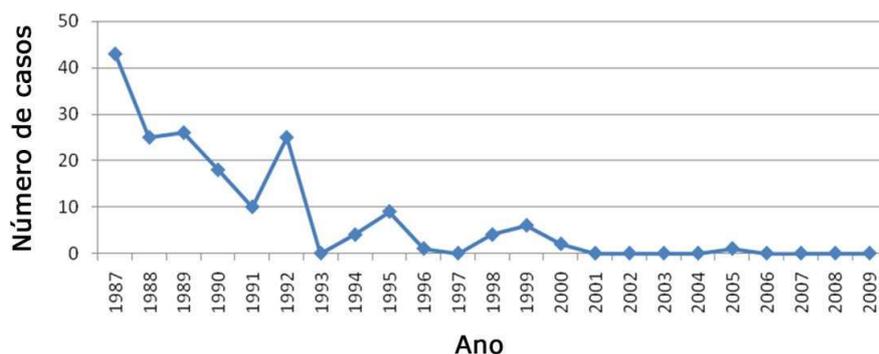


Figura 4 - Casos de peste humana registrados no Brasil. **Fonte:** Almeida et al. 2005; WHO, 2010.

Apesar do silêncio epidemiológico no Brasil, as atividades de vigilância sorológicas têm detectado a presença de anticorpos contra a peste em cães (animais sentinelas), o que sugere circulação permanente da bactéria na natureza e que os focos permanecem ativos. Entre 2007 e 2009, o Serviço Nacional de Referência em peste (SRP-CPqAM/Fiocruz) notificou 231 animais-sentinelas (99.1% cães) soropositivos, distribuídos nos Estados de Pernambuco, Minas Gerais e Rio Grande do Norte (Aragão *et al.*, 2009; SRP-CPqAM/Fiocruz, 2010).

Nos últimos anos, os focos naturais de peste se concentraram nas zonas rurais da África (98%): principalmente em Madagascar e República Democrática do Congo; o restante distribuído na América do Norte: meio-oeste dos Estados Unidos; na Ásia: China, Vietnam e Índia; além do sudeste europeu. Na América do Sul, os focos estão distribuídos na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Peru e Venezuela (WHO, 2010). A figura 5 mostra a distribuição da peste em vários focos do mundo.

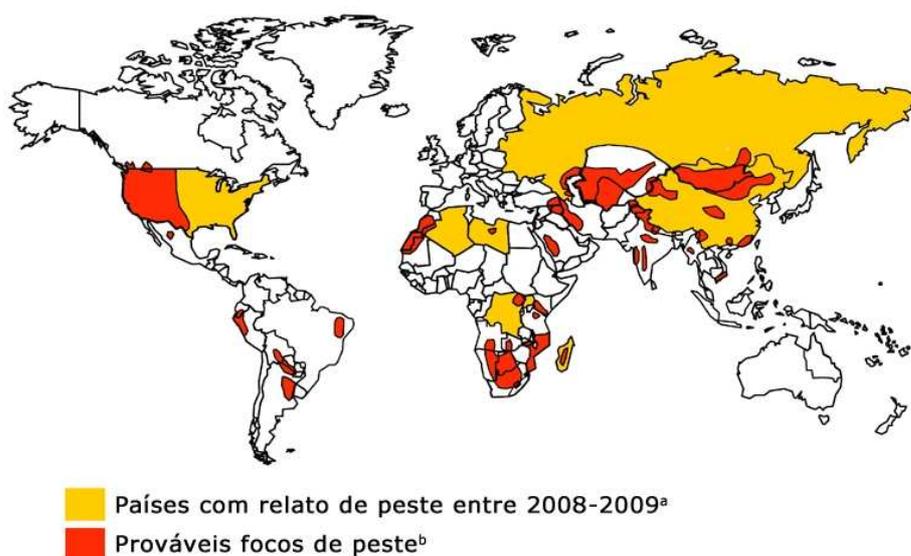


Figura 5 - Distribuição mundial da peste em diferentes focos. **Fonte:** a. WHO, 2010; b. CDC, 1998, com modificações.

Os focos de peste no Brasil foram delimitados com base nos registros de ocorrências de peste humana e animal e nas características bioecológicas da região. Existem duas áreas principais: parte da região nordeste e a Serra dos Órgãos no Rio de Janeiro, que envolve os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo. No Nordeste, os focos estão localizados na região semiárida do Polígono da Seca, compreendendo desde o Estado do Ceará até o norte de Minas Gerais (Figura 6). As condições climáticas e ecológicas destes focos são diferentes das observadas nas regiões circunvizinhas (Almeida *et al.*, 2005; Brasil, 2008; Saavedra and Dias, 2011).



Figura 6 - Principais focos da peste no Brasil. **Fonte:** Brasil, 2008.

2.4 Epidemiologia: o ciclo de transmissão da peste

A peste é uma doença zoonótica de roedores, transmitida através da picada de pulgas infectadas e que pode vir a infectar outros mamíferos, inclusive o homem (Perry and Fetherston, 1997; Leal-Balbino *et al.*, 2009). Periodicamente, ocorrem explosões de surtos entre as populações de roedores susceptíveis a peste, que aumentam os riscos de haver registros de casos humanos. Estes períodos, muitas vezes, podem ser correlacionados com o aumento da fertilidade das pulgas, com o aumento da população de roedores e

uma maior proximidade dos seres humanos com animais infectados (Butler, 2009).

A principal fonte de infecção, na natureza, são os roedores e estima-se que cerca de 200 espécies estejam envolvidas no ciclo epidemiológico da peste. No Brasil, os principais roedores relacionados ao ciclo da peste pertencem aos gêneros: *Necromys* (pixuna), *Calomys* (rato do algodão), *Oligoryzomys* (rato de fava), *Oryzomys* (rato vermelho), *Galea* (preás), *Trychomys* (punarés) e *Rattus rattus* (rato de telhado). Alguns são mais resistentes a doença como o *Galea* e *R. rattus*, enquanto outros, como *Necromys*, são mais sensíveis, passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção. Estas espécies são particularmente importantes na manutenção dos focos naturais de peste (Almeida *et al.*, 2005; Leal-Balbino *et al.*, 2009).

Embora os roedores desempenhem um papel importante no ciclo epidemiológico da peste, o principal mecanismo de transmissão é pela picada de pulgas infectadas (Almeida *et al.*, 2005). Mais de 80 diferentes espécies de pulgas foram identificadas na manutenção do ciclo de transmissão (Carniel, 2008). Das 1200 espécies de pulgas conhecidas, 55 são encontradas no Brasil, das quais *Polygenis bohlsi*, *P. tripus*, *Xenopsylla cheopsis*, *Pulex irritans* e *Ctenocephalides felis* foram identificadas com *Y. pestis* (Almeida *et al.*, 2005).

Outros animais, como lagomorfos, marsupias, carnívoros selvagens e domésticos, também podem contrair a infecção (Figura 7). Aves são refratárias à peste e podem carrear pulgas ou carcaças infectadas para outras localidades (Stenseth *et al.*, 2008). Carnívoros domésticos (cães e gatos) desempenham

um papel importante na vigilância epidemiológica dos focos de peste, pois produzem anticorpos contra o bacilo pestoso por pelo menos 300 dias (Saavedra and Dias, 2011).

A transmissão entre roedor e humano, ocorre, geralmente, pela picada de pulgas infectadas; contudo, a infecção também pode ser resultado da exposição direta (através da mucosa ou escoriações cutâneas) com fluidos contaminados ou inalação de aerossóis contendo o bacilo pestoso (Carniel, 2008) (Figura 7).

O ciclo de transmissão da peste é subdividido em quatro ciclos bioecológicos: Ciclo enzoótico que ocorre entre os hospedeiros naturais, moderadamente resistentes, como certas espécies de roedores silvestres. Ciclo epizoótico ou silvestre que inclui a transmissão do bacilo entre espécies silvestres sensíveis (roedores e lagomorfos), que, frequentemente, morrem e suas pulgas procuram outros hospedeiros (roedores comensais). Pequenos carnívoros (cães e gatos) podem contrair a infecção de roedores silvestres, por ingestão ou picada de pulgas infectadas. O homem pode participar deste ciclo e se contaminar pela picada de pulgas ou pelo contato com animais infectados. Ciclo domiciliar ou urbano ocorre quando as pulgas infectadas dos roedores silvestres envolvidos nas epizootias transmitem a doença aos roedores comensais. As pulgas destes roedores infectam o homem, que desenvolve a forma bubônica da peste. Ciclo pneumônico ocorre diretamente de pessoa a pessoa pela inalação de aerossóis contendo o bacilo pestoso, gerando epidemias humanas (Brasil, 2008) (Figura 7).

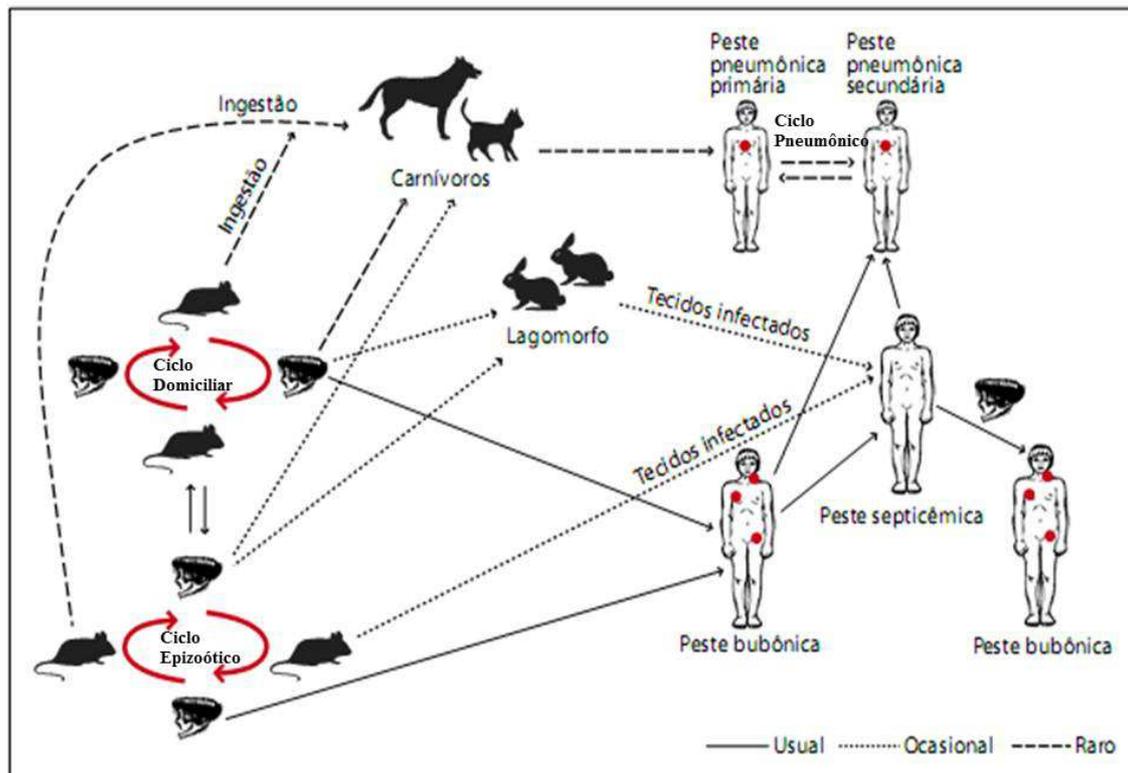


Figura 7 - Ciclo bioecológico da peste. **Fonte:** Brasil, 2008, com modificações.

2.5 Peste: a doença

Clinicamente, a peste humana apresenta três formas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica (Figura 7 e 8): a peste bubônica é a forma mais comum da doença, contraída após a picada de uma pulga infectada. Quando os bacilos são inoculados, ocorre formação de bubões nos linfonodos, frequentemente, nas regiões ínguido-crural (70%), axilar (20%) e cervical (10%) (Koirala, 2006). Na ausência de tratamento apropriado, a taxa de mortalidade varia entre 40% a 70% (Carniel, 2008).

A peste septicêmica é caracterizada pela grave toxemia e grande quantidade de bacilos no sangue. 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 (Inglesby *et al.*, 2000; MS/SVS, 2005; Koirala, 2006).

A peste pneumônica ocorre pela introdução do bacilo através da mucosa respiratória, ou secundariamente à forma bubônica e septicêmica não tratadas. Esta forma clínica é a mais grave e perigosa, devido ao alto grau de contágio, altas taxas de mortalidade (aproximadamente, 100% se não for tratada e >50% com antibioticoterapia) e alta capacidade de provocar epidemias pela formação de aerossóis (Almeida *et al.*, 2005; Prentice and Rahalison, 2007; Brasil, 2008).



Figura 8 - As três 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. **Fonte:** **A e B:** CDC; **C:** Connor; Chandler, 1997.

Existem outras formas clínicas mais raras: meningea e faríngea. A forma meningea é consequente da disseminação hematogênica do bacilo para as meninges. Já a forma faríngea segue-se a inalação ou ingestão de bacilos e está associada à linfadenopatia cervical (Inglesby *et al.*, 2000).

Em oposição às formas graves, existe uma forma clínica discreta e ambulatorial, caracterizada por manifestações leves, que tende à cura

completa, denominada peste benigna ou *pestis minor* (Fundação Nacional de Saúde, 2002; Almeida *et al.*, 2005).

2.6 Diagnóstico Laboratorial

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

Muitas vezes, o diagnóstico da peste, pelos métodos tradicionais de cultivo para isolamento da bactéria, é inviabilizado pelos procedimentos empregados na conservação e transporte das amostras coletadas para exame, que podem causar a morte dos bacilos (Almeida *et al.*, 2005). Os métodos moleculares são utilizados como alternativa para o diagnóstico, pois permitem a identificação de genes plasmidiais e cromossomais de *Y. pestis* e dispensam o cultivo das amostras, possibilitando um diagnóstico rápido, mesmo com material bacteriano inviabilizado (Campbell *et al.*, 1993; Hinnebusch and Schwan, 1993; Leal *et al.*, 1996; Leal and Almeida, 1999; Loiez *et al.*, 2003; Norkina *et al.*, 1994; Qu *et al.*, 2010).

2.7 Tratamento

O tratamento da peste deve ser precoce e intensivo devido à gravidade e a rapidez da evolução da doença. Durante as primeiras 48 horas do tratamento, recomenda-se o isolamento do paciente a fim de minimizar o risco de contaminação nos casos de pneumonia (Brasil, 2008; Almeida and Tavares, 2010).

O uso de antibióticos para o tratamento da peste foi iniciado em 1938 com Sulfonamidas e Estreptomicina, que levou a um declínio da mortalidade. Os principais grupos de antibióticos utilizados, atualmente, na profilaxia e tratamento da peste são Estreptomicina, Tetraciclina, Clorafenicol, Gentamicina, Doxiciclina e Ciprofloxacina (Carniel, 2008).

Em 1995, a primeira cepa resistente aos antibióticos foi isolada de um paciente com sintomas de peste bubônica em Madagascar. Esta resistência é atribuída à aquisição do plasmídeo pIP1202 (Galimand *et al.*, 1997; Guiyoule *et al.*, 2001). O surgimento dessas cepas preocupa a comunidade científica, visto que esta característica pode ser transmitida para novas cepas de *Y. pestis*, dificultando o tratamento e o controle da doença.

2.8 Prevenção e Controle

Caracterizada como uma zoonose, o controle da peste é segmentado na educação em saúde, visando o controle de roedores e pulgas em habitações humanas. O controle nas áreas de focos é realizado através de medidas que evitem o acesso de roedores e suas pulgas a locais frequentados por humanos. 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).

No Brasil, a vigilância da peste é realizada pelos municípios sob a orientação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e baseia-se em inquéritos sorológicos (busca por anticorpos antipestosos) em animais sentinela das áreas de foco e, eventualmente, análises bacteriológicas para pesquisa da *Y. pestis* em vísceras e pulgas coletadas de roedores (Brasil, 2008). Por exigência do Regulamento Sanitário Internacional (RSI), a vigilância também deve ser mantida nos portos e aeroportos internacionais (RSI, 2005).

Os conhecimentos científicos e tecnológicos ainda não são suficientes para erradicar a peste, uma vez que seu agente etiológico permanece firmemente arraigado em seus focos naturais, em roedores e em seus hospedeiros selvagens, o que determina a importância da manutenção de uma vigilância constante e ativa (Brasil, 2008; Saavedra and Dias, 2011).

As primeiras vacinas desenvolvidas contra a peste eram produzidas com cepas atenuadas: USP ou *Killed Whole-Cell* (KWC) que utilizava a cepa de *Y. pestis* 195/P atenuada em preparação com formalina; da mesma forma, a cepa EV-76 utilizada após a deleção do loco *pgm*. Apesar de proteger contra a forma bubônica da doença, estas vacinas eram pouco eficazes contra a forma pneumônica, além de apresentarem vários efeitos colaterais, tendo seu uso interrompido nos Estados Unidos da América (EUA) desde 1999. Atualmente, as vacinas recombinantes com anticorpos contra antígenos específicos da *Y. Pestis* (F1V ou rF1V, e rV10) são alternativas promissoras, porém ainda se encontram em fase de teste (Sun *et al.*, 2011).

Diante da eficiência da terapia antimicrobiana, até o momento a vacinação contra a peste foi descartada; porém, o isolamento de cepas resistentes e as constantes tensões e ameaças de uso da bactéria como arma biológica tem renovado o interesse no desenvolvimento de uma imunização contra peste (Brasil, 2008).

2.9 Visão genômica da *Yersinia pestis*

O genoma da *Y. pestis* é composto por um cromossomo de, aproximadamente, 4.650 kb, com 47,6% de conteúdo de GC e codificante em quase 165 proteínas; e por três plasmídios prototípicos: pPst ou pCP1 (9.5 Kb), pFra ou pMT1 (100 Kb) e pYV ou pCD1 (70 Kb). Já foram registradas cepas atípicas em diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil, que são caracterizadas pela ausência de alguns dos plasmídios ou mesmo a presença de plasmídios crípticos e de resistência a antibióticos (Filippov *et al.*, 1990; Perry and Fertherston, 1997; Leal *et al.*, 1997, 2000; Guiyoule *et al.*, 2001).

Existem 25 genomas de *Yersinia* totalmente sequenciados e publicados na literatura, outros estão em processo de conclusão (GOLD databse, Agosto/2012). Nestes genomas sequenciados, estão incluídos três de *Y. enterocololitica*, quatro de *Y. pseudotuberculosis* e 18 de *Y. pestis*, abrangendo os quatro principais biovars: *Antiqua* (Chain *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2010), *Medievalis* (Deng *et al.*, 2002; Losada *et al.*, 2011), *Orientalis* (Parkhill *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2010) e *Microtus* (Song *et al.*, 2004), além de representantes

do grupo *Pestoide* (Eppinger *et al.*, 2010) e cepas 1348-1350 (Bos *et al.*, 2011; Schuenemann *et al.*, 2011).

Estudos comparativos dos isolados de *Y. pestis* permitiram concluir que esta espécie sofreu grande fluxo gênico, constatado através da aquisição de regiões similares de outras bactérias e vírus (Liang *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). Acredita-se, que estes achados corroborem com a grande mobilidade das sequências, resultante de rearranjos genômicos.

2.9.1 Cromossomo e Plasmídios

No cromossomo da *Y. pestis*, foram identificados numerosos genes estruturais e reguladores responsáveis por funções relacionadas ao metabolismo e patogenicidade da bactéria, além de pseudogenes como *ail* e *inv*, sequências de inserção e sequências de DNA repetitivo (Anisimov *et al.*, 2004). A figura 9 ilustra o genoma cromossomal de uma cepa de *Y. pestis*, destacando alguns genes estruturais e pseudogenes.

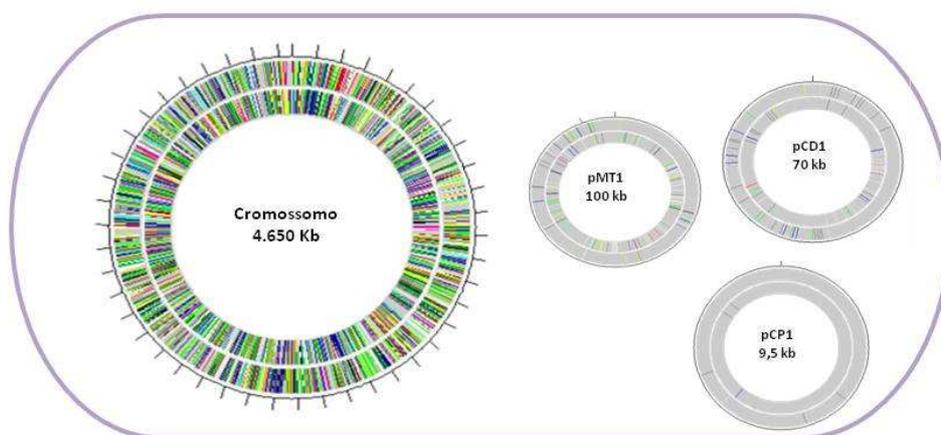


Figura 9 - Representação do genoma de *Yersinia pestis*. **Fonte:** Leal-Balbino, arquivo pessoal.

Uma região de 102 kb é encontrada no cromossomo das yersínias, denominada loco *pgm*, constituída por dois segmentos físico e funcionalmente distintos: segmento de aquisição de ferro (HPI) e o segmento de pigmentação (*hms*). O primeiro é uma ilha de alta patogenicidade com aproximadamente 35 kb, onde se encontram genes envolvidos na biossíntese do sideróforo yersiniabactina (*Ybt*), responsável pela aquisição de ferro pelas yersínias. O segundo segmento, região de estocagem de ferro, apresenta genes responsáveis pelo fenótipo de pigmentação vermelha (Pgm^+) das colônias crescidas em meios ricos em Hemina ou corantes análogos, como Vermelho Congo (Perry and Fetherston, 1997; Anisimov *et al.*, 2004), característica explorada para identificação de cepas patogênicas, que crescem com coloração vermelha e as cepas não patogênicas com coloração branca (Buchrieser *et al.*, 1998) (Figura 10).

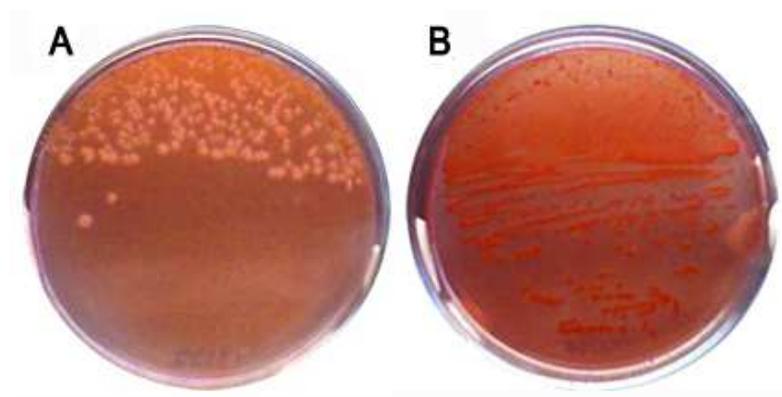


Figura 10 - Caracterização do crescimento de cepas de *Yersinia pestis* crescidas em meio Agar Vermelho Congo. **A:** cepa controle negativo (Pgm^-), *Y. pestis* A1122; **B:** cepa controle positivo (Pgm^+), *Y. pestis* P.CE 882/32R. **Fonte:** Silveira-Filho, 2012.

As manipulações em laboratórios (repiques sucessivos, incubação ou estocagem em diferentes temperaturas) podem acarretar alterações na virulência das culturas pela perda dos plasmídios ou mutações pontuais nos genes de virulência (Leal *et al.*, 1997, 2000; Leal- Balbino *et al.*, 2004, 2006).

Nas três espécies de *Yersinia* patogênicas, o plasmídio pCD1 está presente, sendo indispensável à virulência das bactérias (Butler, 2009). A perda deste plasmídio resulta em avirulência completa em algumas yersínias patogênicas, inclusive a *Y. pestis* (Brubaker, 1983). Este plasmídio possui uma região *lcr* (*low calcium response*), dependente de cálcio, envolvida na regulação de um sistema de secreção do tipo III e de proteínas antifagocíticas - Yops (*Yersinia outer proteins*), responsáveis pela sobrevivência e multiplicação bacteriana nos macrófagos (Cornelis, 2000).

pCP1 é um dos plasmídios específicos da *Y. pestis* e pode estar presente em múltiplas cópias no genoma (Perry and Fetherston, 1997; Prentice and Rahalison, 2007). Este plasmídio tem importância na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro (Hinnebusch, 2003), facilitado pela presença dos genes da pesticina (*pst*), da proteína de imunidade à pesticina (*pim*) e do ativador do plasminogênio (*pla*). A pesticina é uma bacteriocina muito eficiente em circunstâncias de competição entre bactérias; a proteína *pim* responsável pela imunidade da *Y. pestis* a este complexo proteico; e o gene *pla*, com função proteolítica, adesiva e invasiva, importantes para o bacilo se disseminar através da rota periférica de infecção subcutânea ou picada da pulga (Kutyrev *et al.*, 1999; Pouillot *et al.*, 2005).

pMT1 é o segundo plasmídeo exclusivo da *Y. pestis*, que codifica uma fosfolipase D (toxina murina), envolvida no processo de colonização das pulgas e transmissão do bacilo. Além de codificar uma proteína capsular (F1), que é imunogênica ao homem e utilizada para testes de diagnóstico da peste (Du *et al.*, 2002; Hinnebush *et al.*, 2002; Anisimov *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007).

Este plasmídeo é capaz de se integrar ao cromossomo da *Y. pestis*, provavelmente por recombinação homóloga, entre sequências de inserção presentes por todo seu genoma. (Protsenko *et al.*, 1991; Leal-Balbino *et al.*, 2004).

Em todo o genoma da *Y. pestis*, observa-se um elevado número de elementos ou sequências de inserção (IS). Estes elementos são capazes de permitir rearranjos cromossômicos, resultando em inserções, deleções e recombinações (Huang *et al.*, 2002; Motin *et al.*, 2002). Também são identificadas sequências de DNA repetitivo, destacando-se o VNTR (Número Variável de Repetições em Tandem) e o loco CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*/Grupo de Repetição Palindrômica Curta e Regularmente Interespaçada) (Le Flèche *et al.*, 2001; Klevytska *et al.*, 2001; Pourcel *et al.*, 2005).

Nakamura e colaboradores (1987) nomearam as regiões genômicas com repetições em tandem como VNTR (Figura 11). Estas regiões podem ser variáveis quanto ao número de repetições, ao tamanho e a localização (Jeffreys *et al.*, 1985; van Belkum *et al.*, 1997; Grissa *et al.*, 2008). O genoma de *Y. pestis* possui 63 locos de sequências VNTRs (Le Flèche *et al.*, 2001), que já foram utilizados para inúmeros estudos de tipagem.

Por não estarem associadas a nenhum processo transcricional, estas regiões sofrem, frequentemente, mutações que resultam em alterações no seu número de repetições. Estas mutações ocorrem durante a replicação do DNA e podem surgir em combinação com falhas durante o mecanismo de reparo (Strand *et al.*, 1993).

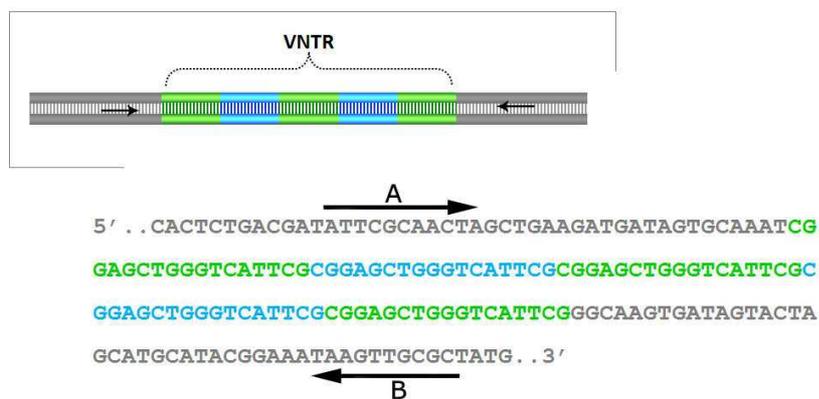


Figura 11 - Representação esquemática de um loco VNTR. Observa-se cinco unidades de repetição, composta por 17 pb (sequências verdes e azuis). As setas indicam regiões de anelamento dos *primers forward* (A) e *reverse* (B). **Fonte:** Silveira-Filho, 2012.

Em 1987, Ishino e colaboradores identificaram um arranjo nucleotídico incomum, composto por repetições não contínuas. Mojica *et al.* (2000) publicaram essa nova organização genômica como uma família de repetições, presentes em muitas outras espécies. Pouco tempo depois, o termo CRISPR foi designado para essa nova família de DNA repetitivo, presente na maioria das Archeas e na metade das bactérias com genomas sequenciados (Jansen *et al.*, 2002). Geralmente, são encontrados no cromossomo; embora, ocasionalmente, apareçam em plasmídios (Horvath *et al.*, 2009; Barrangou and Horvath, 2012).

O loco CRISPR consiste de repetições curtas e diretas ou DRs (*Direct Repeats/Repetição Direta*), aproximadamente com 21 a 48 pares de bases, separadas por sequências polimórficas, chamadas de espaçadores (*spacers*), que variam de 20 a 72 pb (Grissa *et al.*, 2008; Horvath and Barrangou, 2010). As DRs se mostram idênticas em organismos da mesma espécie, salvo a existência de uma repetição degenerada (DG) localizada em uma das suas extremidades. À margem oposta a DG, observa-se a presença de uma região com alto conteúdo de Adenina-Timina (A/T), denominada de Sequência Líder (L), servindo como sítio promotor da transcrição (Jansen *et al.*, 2002; Brouns *et al.*, 2008; Marraffini and Sontheimer, 2010).

Um conjunto de genes, denominados *cas* (CRISPR - assoziados), também está associado ao loco, os quais codificam uma variedade de proteínas: nucleases, polimerases e helicases, e formam o sistema CRISPR/Cas (Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006, 2011). A figura 12 representa a estrutura geral de um loco CRISPR.

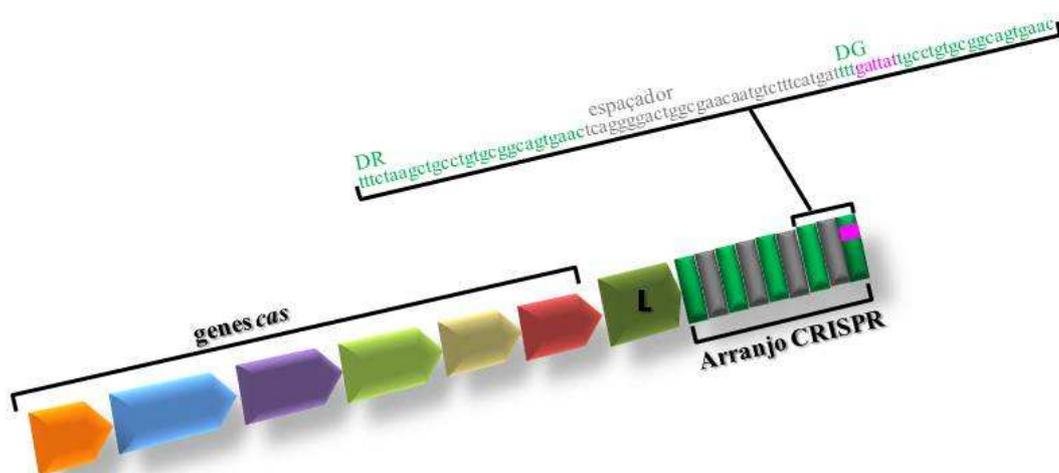


Figura 12 - Representação esquemática do loco CRISPR. DR: Repetição Direta; DG: Repetição Degenerada; Genes *cas* localizados na extremidade da Sequência Líder (L).

Cinco tipos de proteínas Cas já foram definidos: Cas1 e Cas2, classificados como universais, pois estão presentes nos três tipos de sistema CRISPR/Cas (Tipo I, Tipo II e Tipo III); Cas3 (Tipo I), Cas9 (Tipo II) e Cas10 (Tipo III), considerados como proteínas exclusivas para cada tipo de sistema. Outras proteínas são consideradas subtipos e denominadas tipo-dependente, presentes em determinadas espécies bacterianas (Bhaya *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2011) (Figura 13).

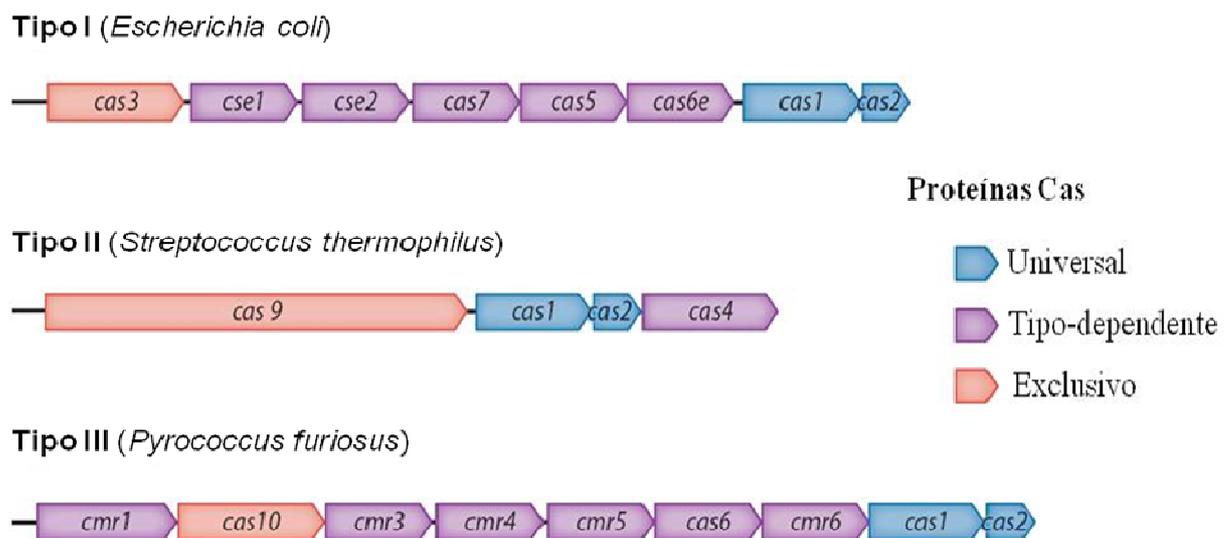


Figura 13 - Representação esquemática dos três tipos de sistema CRISPR/Cas. Tipo I, representado pela estrutura genômica da *Escherichia coli*; Tipo II, por *Streptococcus thermophilus*; e Tipo III, por *Pyrococcus furiosus*. Os genes *cas1* e *cas2*, presentes em todos os sistemas, são visualizados em azul. Os genes exclusivos de cada tipo (Tipo I, *cas3*; Tipo II, *cas9*; Tipo III, *cas10*) são visualizados em vermelho. Os genes tipo-dependentes (ex.: *cas4*, *cas5*, *cas6*, *cas7*) são identificados em roxo. **Fonte:** Modificado de Bhaya *et al.* (2011).

Está comprovado que o sistema CRISPR/Cas se comporta como um sistema de imunidade adaptativa, permitindo que o organismo crie uma memória imunológica. Basicamente, o funcionamento depende da aquisição de pequenos fragmentos de DNA (principalmente de origem viral e plasmidial) e posterior destruição deste DNA através das sequências correspondentes ao fragmento adquirido. A maquinaria das proteínas Cas desempenha um importante papel na mediação dos RNAs CRISPR (crRNA), indispensáveis neste processo biológico (Barrangou and Horvath, 2012).

O mecanismo de defesa do sistema CRISPR/Cas se resume em três etapas: (i) adaptação do CRISPR, através da integração de pequenas sequências do DNA exógeno, como espaçador no loco CRISPR; (ii) expressão do CRISPR e subsequente processamento dos crRNAs; e (iii) defesa contra o DNA exógeno por meio da ação do complexo CRISPR RNA e proteínas Cas (crRNA/Cas) (van der Oost *et al.*, 2009). A figura 14 ilustra o mecanismo de defesa desempenhado pelo sistema CRISPR/Cas.

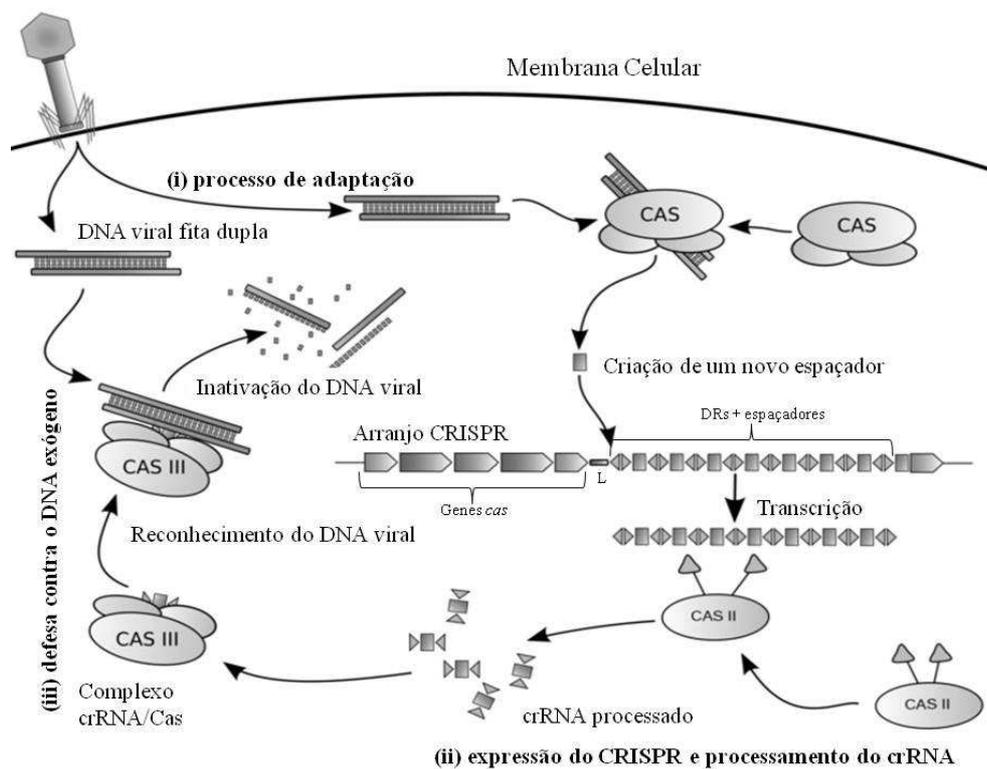


Figura 14 - Esquema do mecanismo de defesa baseado no sistema CRISPR/Cas. **(i)** processo de adaptação após a invasão do DNA exógeno; **(ii)** expressão do CRISPR e processamento do crRNA para inativar o DNA invasor; **(iii)** defesa contra o DNA exógeno através do reconhecimento do DNA pelo complexo crRNA/Cas. DRs representados em triângulos e espaçadores em retângulos. L: sequência Líder. **Fonte:** Modificado de van der Oost *et al.* (2009).

O processo de aquisição das sequências de DNA ocorre pela ação das proteínas Cas, que reconhece o material exógeno, cliva e auxilia na inserção no loco CRISPR. A incorporação ocorre de forma polarizada, sempre adjacente a Sequência Líder (Bhaya *et al.*, 2011; Barrangou and Horvath, 2012). De acordo com a localização dos espaçadores no loco, são classificados como Espaçadores Região-Específicos ou RSSs (*Region-Specific Spacer*), próximos a Sequência Líder e relacionados ao foco de isolamento; e Espaçadores Espécie-Específico ou SSSs (*Species-Specific Spacers*), àqueles mais

frequentes e conservados, mais distantes da Sequência Líder e relacionados a uma característica da espécie (Cui *et al.*, 2008).

No genoma da *Y. pestis*, existem três locos CRISPR (YPa, YPb e YPc), presentes no cromossomo e sem localização física específica, devido a rearranjos ocorridos no DNA da bactéria (Cui *et al.*, 2008) (Figura 15). Alguns trabalhos exploraram o uso dos locos CRISPR em análise epidemiológica e evolutiva, 137 espaçadores foram descritos e relacionados a outros focos de peste (Pourcel *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2008; Riehm *et al.*, 2012).

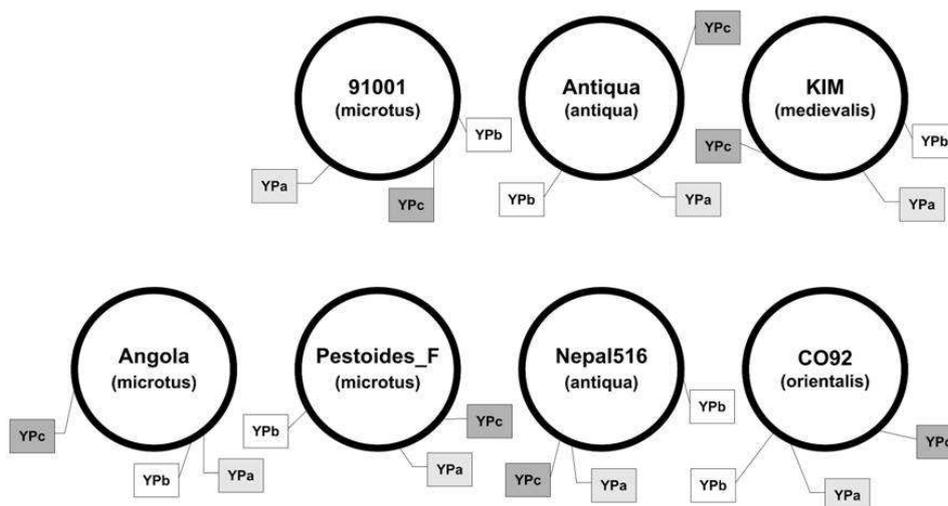


Figura 15 - Representação esquemática das diferentes localizações dos locos CRISPR no genoma de cepas de *Yersinia pestis*. Fonte: Cui *et al.*, 2008.

Y. pestis está distribuída no Tipo I do sistema CRISPR/Cas, juntamente com *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Além dos genes *cas1* e *cas3*, outros quatro são específicos da espécie: *csy1*, *csy2*, *csy3* e *casf6* (Bhaya *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços nas pesquisas do sistema CRISPR/Cas e suas aplicações em tipagem (baseada na hipervariabilidade dos espaçadores), no controle de resistência ao fago e da disseminação de elementos genéticos (como genes de resistência a antibióticos), alguns aspectos do mecanismo de ação ainda permanecem desconhecidos: a origem das DRs, o reconhecimento da sequência exógena e sua incorporação ao loco (Horvath and Barrangou, 2010; Karginov and Hannon, 2010).

2.10 Métodos Moleculares aplicados em estudos de *Yersinia pestis*

As restrições dos métodos fenotípicos levaram ao desenvolvimento de métodos moleculares baseados no genótipo microbiano ou sequência de DNA, que minimizam os problemas de diferenciação e reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de grandes bancos de dados do organismo caracterizado (Olive and Bean, 1999).

Diferentes técnicas têm sido empregadas para identificação e comparação de isolados de *Y. pestis*, sendo a maioria baseada na PCR, como RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente), PCR-Ribotipagem, RFLP-IS (Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição-Sequências de Inserção), MLVA (análise dos múltiplos locos VNTR), análise dos locos CRISPR, além de outras técnicas: PFGE e SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) (Leal, 1998; Huang *et al.*, 2002; Sobreira, 2003; Pourcel *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, *in press*; Barros *et al.*, *in press*; Touchman *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008; Morelli *et al.*, 2010).

2.10.1 RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente)

A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de segmentos de DNA através da PCR. É uma ferramenta útil para genotipagem de bactérias, pois permite estudar o perfil genômico como um todo, incluindo sequências plasmidiais, não necessitando de conhecimento prévio do genoma bacteriano (Hudson *et al.*, 1973, 1975).

Apesar dessas vantagens, esta técnica apresenta difícil reprodutibilidade, sofrendo interferência da qualidade e quantidade do DNA, variação do modelo do termociclador, da marca e até do lote da enzima utilizada nas reações (Grissa *et al.*, 2008). Estudos utilizando esta ferramenta, em cepas brasileiras de *Y. pestis*, revelou um padrão homogêneo entre os isolados oriundos de diversos focos (Leal, 1998).

2.10.2 PCR – Ribotipagem

Outra abordagem molecular que tem permitido a identificação e comparação de isolados bacterianos é a PCR-Ribotipagem, baseada na amplificação da região espaçadora dos genes codificadores de rRNA 16S e 23S (de 2 a 14 cópias) (Kostman *et al.*, 1992).

Para estudos de *Y. pestis*, trata-se de uma ferramenta pouco informativa, pois analisa uma pequena parte do genoma correspondente aos locos ribossomais (Grimont and Grimont, 1986). Quando aplicada em cepas de

Y. pestis do Brasil, a técnica demonstrou um padrão idêntico para cepas de diferentes focos e fontes de isolamento (Sobreira, 2003).

2.10.3 RFLP-IS (Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição-Sequências de Inserção)

As sequências de inserção (IS) também são utilizadas como marcadores moleculares, devido a sua capacidade de se inserir em múltiplos sítios de uma molécula alvo, participando de rearranjos cromossômicos, causando inserções, deleções e recombinações (Huang *et al.*, 2002; Motin *et al.*, 2002).

A análise das ISs mostra-se eficaz na caracterização de diferentes espécies (Baquar *et al.*, 1994; Bik *et al.*, 1996; Motin *et al.*, 2002), porém estudos mais aprofundados em cepas de *Y. pestis*, isoladas dos focos de peste do Brasil, são necessários para esclarecer sua aplicabilidade (Silva, 2004).

2.10.4 SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

Métodos baseados no polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) permitem uma análise detalhada e específica da variação dentro de organismos relacionados. Os SNPs são uma classe de polimorfismos que surge a partir de mudanças em nucleotídeos únicos de uma determinada sequência de DNA (Baker *et al.*, 2010).

Estudos baseados nos SNPs já foram realizados em cepas de *Y. pestis*, incluindo os três biovars clássicos (Touchman *et al.*, 2007; Morelli *et al.*, 2010). Dezesete genomas de isolados de *Y. pestis* de diferentes fontes, de todo o mundo, foram comparados; incluindo 933 SNPs em 286 isolados. Este estudo promoveu um embasamento genético para reconstrução histórica das pandemias de peste (Morelli *et al.*, 2010).

2.10.5 MLVA (Análise dos múltiplos locos VNTR)

O MLVA é utilizado como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias patogênicas. Esta técnica detecta polimorfismos no número de cópias dos segmentos repetidos em tandem, que podem resultar de eventos de inserção ou deleção nas regiões VNTRs (Adair *et al.*, 2000; Klevytska *et al.*, 2001; Le Flèche *et al.*, 2001; Achtman *et al.*, 2004; Pourcel *et al.*, 2004; Lowell *et al.*, 2005). O polimorfismo destas regiões é analisado a partir de uma PCR, em que os pares de *primers* são direcionados as regiões flaqueadoras destes locos e os *amplicons* analisados em gel de eletroforese.

Esta técnica é utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos, especialmente por identificar polimorfismo no genoma de espécies bacterianas, geneticamente homogêneas (van Belkum, 1999). Em *Y. pestis*, o estudo de alguns locos VNTRs auxiliou na tipagem e epidemiologia molecular desta espécie (Le Flèche *et al.*, 2001; Pourcel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009).

2.10.6 Análise dos locos CRISPR

A análise das sequências CRISPR tem sido utilizada em genotipagem para algumas bactérias, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Campylobacter jejuni*, inclusive cepas de *Y. pestis* de outros focos de peste (Filliol *et al.*, 2003; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005; Brudey *et al.*, 2006; Price, *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008; Riehm *et al.*, 2012).

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

A tipagem realizada pelos locos CRISPR é baseada na hipervariabilidade das sequências espaçadoras. O conteúdo e a variabilidade dos espaçadores CRISPR, mesmo em cepas da mesma espécie ou intimamente relacionadas, promovem uma base genética para tipagem de cepas (Barrangou and Horvath, 2009). Além disso, sua localização cromossômica e a estabilidade genética destas regiões favorecem sua utilização em estudos de genotipagem (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2008).

2.10.7 PFGE

O PFGE tornou-se uma das técnicas muito utilizadas para a caracterização de diversos microrganismos, incluindo os membros da família Enterobacteriaceae, como *Y. pestis*; *Enterococcus* spp; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida* spp; entre outros (Huang *et al.*, 2002; Botes *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2003; Grammenou *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2009). Quando confrontado com informações epidemiológicas e outros métodos de tipagem, PFGE tem demonstrado um alto poder discriminatório, sendo comparável ou superior a outras técnicas disponíveis (Olive and Bean, 1999; Huang *et al.*, 2002).

A análise genômica do PFGE é caracterizada pela identificação de padrões gerados após a digestão do DNA cromossômico por endonucleases de corte raro, seguida pela separação dos fragmentos por eletroforese com alternância direcional do campo elétrico. Isso possibilita a separação de fragmentos com elevado peso molecular. O PFGE permite agrupar os isolados, evidenciando as variações genômicas, importantes nas investigações epidemiológicas (den Dunnen and van Ommen, 1992).

2.11 *Yersinia pseudotuberculosis* versus *Yersinia pestis*

Evidências moleculares suportam o fato que a *Y. pseudotuberculosis*, responsável por Yersiniose em animais e humanos, é o ancestral recente da *Y.*

pestis, entre 1500 a 20000 anos atrás (Achtman *et al.*, 1999). Esta divergência foi caracterizada pela aquisição de alguns elementos genéticos, que desempenham um papel importante na transmissão da bactéria (Stenseth *et al.*, 2008).

A patogenicidade da *Y. pestis*, quando comparada com espécies enteropatogênicas, pode ser explicada pelo novo modelo de transmissão através da picada de pulgas. Acredita-se que seja uma adaptação evolutiva recente que a distinguiu da *Y. pseudotuberculosis* e outras bactérias entéricas (Hinnebusch, 2005).

Uma análise de seis genes *housekeeping* (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*, *manB*), em 36 isolados de *Y. pestis* dos três biovars clássicos, não demonstrou polimorfismo nas sequências. Alguns desses genes compartilharam semelhanças com os genes da *Y. pseudotuberculosis*, reforçando a hipótese de evolução da *Y. pestis* (Achtman *et al.*, 1999).

Estudo comparativo do genoma das cepas IP32953 (*Y. pseudotuberculosis*) e CO92 (*Y. pestis*) revelou aspectos do processo evolutivo que transformou um ancestral enteropatogênico em dois patógenos com manifestações clínicas distintas (Chain *et al.*, 2004). Em decorrência dos 95% de similaridades entre as duas espécies, foi proposto que estas fossem agrupadas numa única espécie, denominada de *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pestis*. No entanto, a proposta de reclassificação não foi estabelecida (Perry and Fetherston, 1997).

Estudos voltados nas diferenças entre os isolados de *Yersinia* revelaram que os 32 genes cromossomais da *Y. pestis*, junto com os dois plasmídios,

específicos da espécie, representam o material genético adquirido desde sua divergência da *Y. pseudotuberculosis*. Em contrapartida, 149 pseudogenes e 317 genes ausentes foram identificados no seu genoma. Os rearranjos genômicos, mediados pelas sequências de inserção, e a perda de genes, que resultou na eliminação e modificação de vias de expressão gênica, parece ser tão importante quanto à aquisição de genes na evolução da *Y. pestis*. Estes resultados promovem um exemplo de como uma espécie, altamente virulenta, pode surgir de uma espécie pouco virulenta (Chain *et al.*, 2004).

A expansão dos elementos de inserção e inativação de genes de adesão e invasão, que ocorreram durante o surgimento da *Y. pestis*, também são indicativos do mecanismo que levaram à evolução deste patógeno (Chain *et al.*, 2004). As sequências de inserção (IS) correspondem a cerca de 3% do genoma na *Y. pestis* (117, KIM; 138, CO92). Devido as recombinações ocasionadas pelas ISs, as estruturas genômicas das cepas de *Y. pestis* podem ser diferentes, embora seu conteúdo e sequência nucleotídica sejam similares (Song *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, a peste ainda não foi erradicada, permanecendo como importante problema de Saúde Pública e grande ameaça no mundo atual. Embora no Brasil a ocorrência de peste humana se limite a casos esporádicos, os focos continuam ativos e a peste permanece enraizada no país.

Em vista da curta história evolutiva da *Y. pestis*, o estudo do seu genoma contribuirá no enriquecimento da sua reconstrução evolutiva. Os meios de adaptação, permanência e disseminação de clones de *Y. pestis* nos focos do Brasil, ainda não estão esclarecidos. O Serviço Nacional de Referência em Peste (SRP) mantém uma coleção biológica (Fiocruz – CYP) de 917 cepas de *Y. pestis*, que não estão, completamente caracterizadas. O estudo destas cepas fornecerá dados importantes para elucidarmos o processo microevolutivos da *Y. pestis* no Brasil.

O PFGE é considerado um dos principais métodos de tipagem molecular, demonstrando eficiência na diferenciação de inúmeros patógenos bacterianos. Os estudos aplicados em cepas de *Y. pestis*, de outros focos do mundo, revelaram resultados eficientes na caracterização dos isolados.

A análise das sequências VNTRs possibilita determinar uma correlação entre os grupos genéticos e dados epidemiológicos, que contribuem na vigilância e controle do surgimento de novas cepas de *Y. pestis*.

Estudos já demonstraram que a análise dos locos CRISPR é capaz de fornecer dados importantes sobre a microevolução e a disseminação da *Y.*

pestis em diferentes focos do mundo, além de ser utilizado para tipagem e estudos filogenéticos em outros gêneros bacterianos.

Até o momento, não se sabe qual ou quais métodos de tipagem são mais adequados na caracterização molecular das cepas de *Y. pestis*, que foram isoladas de diferentes focos pestosos do Brasil, em diferentes períodos e fontes de isolamento. É de grande importância para vigilância e controle da peste dar continuidade à caracterização dos isolados de *Y. pestis* no país.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Realizar caracterização genética e evolutiva de cepas de *Yersinia pestis*, isoladas de diferentes focos do Brasil.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar e analisar, estruturalmente, os locos CRISPR para melhor compreender a microevolução adaptativa das cepas brasileiras de *Y. pestis*;
- Realizar tipagem molecular, por diferentes métodos, de cepas de *Y. pestis* isoladas de diversos focos do Brasil e comparar a melhor aplicação dos marcadores nos estudos epidemiológico-moleculares;
- Correlacionar os dados moleculares obtidos pelos marcadores com a distribuição geográfica de cada isolado de *Y. pestis*.

5 CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido para revista *Microbiology*.

Título: Dinâmica dos locos CRISPR no processo microevolutivo de cepas de *Yersinia pestis*

Subtítulo: Microevolução de *Yersinia pestis*

Autores: M.P.S. Barros^{1, 2}, C. T. França¹, M.D.V. Santos¹, R.H.F.B. Lins^{1,2}, E.J. Silva¹, M.B.M. Oliveira³, V.M. Silveira-Filho¹, A.M.P. Almeida¹, V.Q. Balbino¹ e T.C. Leal-Balbino^{1,2}

Afiliação Institucional:

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

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

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

Autor de correspondência:

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE). Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. 50670-420. Tel: 55-81-2101.2696. Fax: 55-81-2101.2647.

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

RESUMO. Exploramos neste trabalho, o uso potencial dos locos CRISPR em 146 cepas da coleção de *Yersinia pestis* de diferentes origens geográficas e quatro biovars, além de oito representantes de *Yersinia pseudotuberculosis*. Todas as cepas de *Y. pestis* amplificaram e apresentaram os locos CRISPR. A maioria das cepas do biovar *Orientalis* apresentou o mesmo arranjo de

espaçadores, permitindo que estabelecêssemos uma assinatura CRISPR para este biovar; igualmente, para os isolados do biovar *Medievalis*. Não foi possível estabelecer esta assinatura nos isolados do biovar *Antiqua*, devido à grande diversidade observada. A análise estrutural dos locos CRISPR das cepas dos focos de peste do Brasil mostrou 16 espaçadores novos para o loco YPa, cinco para o YPb e nenhum para o loco YPc. Este mesmo grupo de cepas do Brasil foi distribuído em 24 genótipos, 69,6% pertencentes ao genótipo G1. Esta elevada semelhança suporta a evidência histórica de um único clone fundador dos focos de peste no Brasil. Os demais genótipos demonstraram a microevolução da bactéria nestes ambientes. Uma grande diversidade de espaçadores foi verificada nas cepas de *Y. pseudotuberculosis*, 17 novos espaçadores para o loco IPa, sete para o IPb e 19 para o IPc. Alguns dos novos espaçadores foram compartilhados com a *Y. pestis*. O estudo forneceu um suporte significativo na dinâmica dos locos CRISPR em um grupo intraespecífico de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Os achados confirmam uma única entrada clonal de cepas de *Y. pestis*, além de genótipos exclusivos, importantes na permanência dos focos de peste no Brasil.

INTRODUÇÃO

Os locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) são compostos por sequências repetitivas separadas por sequências espaçadoras, geralmente adquiridas de elementos genéticos exógenos. Estão presentes em diferentes números de cópias nas archeas e bactérias. Foram registrados, primeiramente, em *Escherichia coli* K12 (Ishino *et al.*, 1987), recebendo a denominação CRISPR apenas em 2002 (Jansen *et al.*, 2002). A sequência Líder, localizada na extremidade 5' da primeira repetição, é uma região rica em A-T, que parece funcionar como o sítio promotor da transcrição (Jansen *et al.*, 2002). Em associação com as proteínas Cas (Crispr associated protein), estes locos formam um sistema imunológico adaptativo que protege a bactéria contra a invasão de fagos e plasmídios, além de desenvolver atividades regulatórias a níveis transcricionais dentro da célula (Al Attar *et al.*, 2011; Barrangou & Hovarth, 2012).

Embora os estudos do sistema CRISPR/Cas ainda não sejam completamente compreendido, pesquisas tem revelado a importância desse sistema para aplicação industrial e acadêmica, resistência bacteriana através de fagos (Barrangou *et al.*, 2007), controle da disseminação de genes via transferência plasmidial (Palmer & Gilmore, 2010; Nozawa *et al.*, 2011), domínio do seu próprio nível transcricional (Hale *et al.*, 2009; Garrett *et al.*, 2011), genotipagem de cepas (Cui *et al.*, 2008; Mokrousov *et al.*, 2009; Abadia *et al.*, 2011; Cady *et al.*, 2011; Riehm *et al.*, 2012) e dinâmica populacional microbiana (Andersson & Banfield, 2008; Horvath *et al.*, 2008; Rezzonico *et al.*, 2011).

Em *Yersinia pestis* foram identificados três locos CRISPR denominados YPa, YPb e YPc e 137 sequências espaçadoras, evidenciando diversidade genética nesta espécie (Pourcel *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2008; Riehm *et al.*, 2012). 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 (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). Contribuições adicionais vêm cooperando para caracterização molecular destes locos (Pourcel *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2008; Riehm *et al.*, 2012).

Acredita-se que *Yersinia pestis* evoluiu da *Y. pseudotuberculosis*, sorotipo O:1b, aproximadamente 1.500 a 20.000 anos atrás, compartilhando mais de 95 % de semelhança genética (Achtman *et al.*, 1999, 2004; Skurnik *et al.*, 2000). As diferenças encontradas podem ter reflexos na evolução e adaptação das espécies em seus respectivos nichos. Enquanto a *Y. pseudotuberculosis* causa uma doença enteropatogênica transmitida pela água e solo, *Y. pestis* é o agente causador da peste, uma doença altamente infecciosa, transmitida entre animais e humano pela picada da pulga, por contato direto ou inalação. A peste é considerada reemergente pela OMS, com aparente tendência ao aumento do número de casos e de sua dispersão geográfica (Chain *et al.*, 2004; Stenseth *et al.*, 2008). No Brasil, apesar do silêncio epidemiológico, são detectados anticorpos antipestosos em animais sentinelas durante atividades de vigilância sorológica (Aragão *et al.*, 2009; Serviço de Referência em Peste, 2011 – Comunicação pessoal).

Ensaio bioquímicos (Devignat, 1951) classificam as cepas de *Y. pestis* em três biovars: *Antiqua*, *Medievalis* e *Orientalis*, associadas as grandes pandemias de peste. Até o momento, este cenário é suportado pela grande diversidade observada nos biovars *Antiqua* e *Medievalis*, através das sequências de inserção e origem geográfica dos isolados (Achtman *et al.*, 1999; Guiyoule *et al.*, 1994; Motin *et al.*, 2002). O biovar *Microtus*, comparado com os demais, apresenta perda de genes e distribuição de pseudogenes, que podem ser responsáveis pela avirulência em humanos (Zhou *et al.*, 2004).

Estudos anteriores realizados em cepas de coleção de *Y. pestis* mostraram diversidade genética nesta espécie, particularmente em cepas associadas à última pandemia (Oliveira *et al. in press*; Barros *et al. in press*; Pourcel *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2008). Neste trabalho, exploramos o uso potencial do loco CRISPR em 146 cepas de *Y. pestis* de diferentes origens geográficas e quatro biovars, além de oito representantes de *Y. pseudotuberculosis*. Descrevemos um conjunto de novos espaçadores, que contribuíram para genotipagem e compreensão da microevolução dos isolados de *Y. pestis* nos focos de peste do Brasil.

MÉTODOS

Cepas bacterianas e condições de cultivo. Os três locos CRISPR foram analisados em 128 cepas da coleção de *Y. pestis* (Fiocruz - CYP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, biovar *Orientalis*, de cinco focos de peste do Brasil, isoladas de humanos, roedores e pulgas no período de 1966 a 1997; além de 18 cepas provenientes de focos da Ásia, África e América (biovars *Antiqua*, *Medievalis*, *Orientalis* e *Microtus*), e oito *Y. pseudotuberculosis* (Tabela Suplementar S1). As culturas foram mantidas em Agar Peptona, a 4°C, e inoculadas em BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, HIMEDIA) a 28°C por 48 h. Cada cultura crescida foi plaqueada em BAB (*Blood Agar Base*, HIMEDIA) e incubadas por 48 h a 28°C.

Extração de DNA e amplificação dos locos CRISPR. A extração do DNA genômico foi realizada pela técnica de lise térmica conforme Keim *et al.* (2000)

e adaptada por Oliveira *et al.* (*in press*). Os padrões da reação de PCR foram realizados de acordo com Le Flèche *et al.* (2001) e os *primers* utilizados para amplificação dos locos nas cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* foram descritos por Pourcel *et al.* (2005). Os *primers* para amplificação da sequência Líder, nos três locos, foram desenhados utilizando os programas *Primer 3* (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>) e *AutoDimer* (Vallone; Butler, 2004): CRISPR YPa L (5'-GGGGGAGACATATTTATAGGC-3'); CRISPRYPb L (5'-GGTTCAGGGGAGTGGTTATC-3'); CRISPR YPc L (5'-ACCGGATAGCGGAT AATGC-3').

Purificação e Sequenciamento. Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *Purelink PCR purification* (Invitrogen, Brasil), seguindo as orientações do fabricante. O produto purificado foi sequenciado no sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), usando o Kit *BigDye* (Applied Biosystems).

Análise dos locos CRISPR. As sequências foram analisadas pelo programa DNASTAR (DNASTAR, Inc), MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) e Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc). CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/>) foi utilizado para confirmar a identidade das sequências. As sequências espaçadoras foram analisadas através do BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para pesquisa de sequências homólogas depositadas no banco de dados do NCBI (<http://ncbi.nih.nlm.gov>). A nomenclatura dos novos espaçadores identificados em *Y. pestis* está de acordo com a descrita anteriormente por Cui *et al.* (2008) e Reihm *et al.* (2012). Em *Y. pseudotuberculosis* foram denominados de IPa para o loco YPa, IPb para o YPb e IPc para o YPc. Dez genomas de *Y. pestis* depositados no GenBank (A1122: NC_017168, Z176003: NC_014029, D106004: NC_017154, D182038: NC_017160, Harbin 35: NC_017265, Angola: NC_010159, Antiqua: NC_008150, Nepal516: NC_008149, 91001: NC_005810, Pestoides F: NC_009381) e três genomas de *Y. pseudotuberculosis* (IP3758: NC_009708, PB1/+: NC_010634, YPIII: NC_010465) tiveram seus locos CRISPR estudados pela amplificação *in silico*. Um dendrograma, com as cepas de *Y. pestis* e uma representante de *Y. pseudotuberculosis* (IP32953), foi gerado pelo programa MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). O cálculo das

distâncias foi realizado com base nos dados binários codificados pela presença e ausência de cada espaçador.

Sequências depositadas no GenBank/NCBI. Os locos CRISPR foram submetidos e publicados no banco de dados GenBank, com os seguintes números de acesso: YPa (GI:406828460; GI:406828461; GI:406828462; GI:406828463; GI:406828464; GI:406828465; GI:406828466; GI:406828467; GI:406828468; GI:406828469; GI:406828470; GI:406828471; GI:406828472; GI:406828473) e YPb (GI:406828474; GI:406828475; GI:406828476; GI:406828477; GI:406828478; GI:406828479).

RESULTADOS

Estrutura dos locos CRISPR em *Y. pestis*

Os três locos CRISPR (YPa, YPb e YPc) foram amplificados e sequenciados em 128 cepas de *Y. pestis* dos focos do Brasil e em oito de outros focos de peste do mundo. Além de identificados *in silico* em 10 cepas estrangeiras, com exceção da *Y. pestis* Angola que possui apenas o loco YPa. As repetições diretas (DRs) foram separadas por espaçadores de 32 ou 33 pb e conservadas nos três locos, compostas por 28 pb e sequência 5'-TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'. Na extremidade oposta à sequência Líder, verificamos a presença da DR degenerada: YPa 5'-TTTGATTATTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'; YPb 5'-TCTATAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'; YPc 5'-TTATTGGGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3'. As cepas analisadas dos focos da Ásia, África e América apresentaram a mesma sequência de DR e DR degenerada observada nas cepas dos focos do Brasil.

Novos espaçadores foram encontrados nas cepas de focos do Brasil, 16 para o loco YPa e cinco para YPb, além de 18 espaçadores, previamente descritos (Pourcel *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2008; Riehm *et al.*, 2012). Não foram observados novos espaçadores para o loco YPc. Onze espaçadores são

similares a sequências virais, e os demais a sequências plasmidiais (4) e cromossomais (6) (Tabela 1).

De acordo com o arranjo de espaçadores CRISPR presentes nos três locos, as 128 cepas brasileiras foram agrupadas em 24 genótipos (G1-G24) (Tabela S1; Fig. 1). Oitenta e nove (69,6%) pertencentes ao genótipo G1 (a1a2a3a4a5a6a7a8; b1b2b3b4b5; c1c2c3), idêntico à cepa padrão CO92, seguido por G2 (7), G17 (6), G7 (4) e G19 (3). Os demais representantes apresentaram genótipos específicos. Quinze cepas estrangeiras foram agrupadas em 11 genótipos (G25-G35); os isolados dos focos da Birmânia e de Madagascar (PB8, PBM5 e EV76) apresentaram o mesmo genótipo (G1), encontrado na maioria das cepas brasileiras. As cepas Harbin35 e PKR684; D106004 e Z176003 foram distribuídas nos genótipos, G28 e G31, respectivamente (Tabela S1; Fig. 1).

Os biovars de *Y. pestis* foram distribuídos em diferentes clusters. Os representantes do biovar *Antiqua* formaram singletons, com exceção das cepas Z176003 e D106004, que compartilharam o mesmo cluster. O biovar *Medievalis* foi distribuído em clusters muito próximos do biovar *Orientalis* (Fig. 1)

A cepa estrangeira *Y. pestis* ALEXANDER (G26), biovar *Orientalis*, apresentou um novo espaçador no loco YPa, e a cepa PERU (G29), também *Orientalis*, no loco YPb (Fig. 1). Além das inserções, também foram observadas deleções de espaçadores nas cepas analisadas. No loco YPa (G5, G17, G18, G20, G27, G28, G30, G31, G32, G33, G34, G35, Angola), foi observado deleção de até sete espaçadores e no YPb (G20, G22, G25, G27, G28, G30, G31, G32, G33, G34, G35,) de quatro espaçadores (Fig. 1). Não foi observada diversidade nucleotídica na sequência Líder dos três locos investigados.

Todos os representantes do biovar *Antiqua* apresentaram um alto grau de diversidade genética nos espaçadores CRISPR para o loco YPa, enquanto que para YPb e YPc algumas cepas compartilharam os mesmos espaçadores CRISPR. O arranjo b1b2b3b4 (YPb) foi idêntico nas cepas Nepal516 (G33) e Z176003 (G31), enquanto que na cepa *Antiqua* (G30) foi observada uma inserção de um espaçador (b8) e duas deleções (b3 e b4). O padrão c1c2c3 (YPc) permaneceu conservado nas amostras deste biovar, exceto na cepa

Pestoides F (G34) que apresentou alterações nos três locos (Tabela S1; Fig. 1).

O representante do biovar *Microtus*, a cepa 91001 (G35), apresentou arranjo específico dos espaçadores CRISPR no loco YPa e compartilha, juntamente com as cepas dos biovars *Antiqua* e *Medievalis*, o mesmo arranjo no loco YPb, porém apresenta um arranjo único para o loco YPc (Tabela S1; Fig. 1).

O padrão de espaçadores observado no biovar *Medievalis* foi idêntico nas cepas PKR684 e Harbin35 (G28: a1a2a3; b1b2b3b4; c1c2c3) e distintos nos demais representantes (G25; G27) (Tabela S1; Fig. 1).

Y. pestis* versus *Y. pseudotuberculosis

A maioria das cepas de *Y. pseudotuberculosis* apresentou a mesma sequência DR e DG observadas nas *Y. pestis*, com exceção das cepas IP31553 e IP32950, que não amplificaram o loco IPa e não possuem o conjunto repetição-espaçador do CRISPR IPb. A cepa IP32952 possui a mesma DR atípica do loco IPa (5'-TTTCTAAGCTGCCTGTGCAGCAGTGAAC-3'), substituição de uma guanina por adenina, identificada no loco YPa de *Y. pestis*, enquanto as cepas IP32950 e YPIII apresentaram DR atípica no loco IPc (5'-TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAT-3'), substituição de uma citosina por timina. A repetição degenerada do loco IPb (5'-TCTATAAGCTGCCTGTACGGCAGTGAAC-3') foi diferente da observada em *Y. pestis*, exceto a cepa IP32952 que possui a mesma sequência.

Além dos 184 espaçadores depositados nos bancos de dados, 43 novos foram identificados nas cepas de *Y. pseudotuberculosis*: 17 para o IPa, sete para o IPb e 19 para o IPc. Alguns dos novos espaçadores das cepas IP32944 e IP32952 já foram previamente descritos em *Y. pestis* (Tabela 2). As cepas analisadas apresentaram elevada diversidade de arranjo de espaçadores CRISPR para os três locos. Evento de duplicação foi identificado apenas no loco IPa na cepa YPIII. O loco IPb se mostrou com menor atividade, apresentando um a seis espaçadores entre os isolados. O IPc foi amplificado e

identificado em todas as cepas de *Y. pseudotuberculosis*, com tamanho e diversidade superior as cepas de *Y. pestis*.

Dos novos espaçadores analisados, poucos apresentaram similaridade conhecida com regiões gênicas ou cromossomais. IPc73 (IP31553) mostrou-se similar a sequência do gene YPO2468, codificante da Proteína Cas1 - associada ao CRISPR. Os demais compartilharam apenas um trecho da sequência com regiões cromossomais de diversos organismos, como *Candida orthopsilosis*, *Clostridium perfringens* e *Schistosoma mansoni*.

A sequência Líder das cepas de *Y. pseudotuberculosis*, analisadas *in silico*, apresentou grande similaridade com as de *Y. pestis* para os locos YPa e YPc (Fig. 2).

Genes cas

A análise *in silico* revelou a localização dos genes *csy1*, *csy2*, *csy3*, *cas6f* associados apenas ao loco YPa no genoma de *Y. pestis*, adjacentes aos genes *cas1* e *cas3* previamente descritos por Pourcel et al. (2005). A mesma distribuição dos genes *cas* foi observada nas cepas de *Y. pseudotuberculosis* (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Polimorfismo CRISPR em *Yersinia pestis*

Neste trabalho, analisamos os alelos dos três locos CRISPR em um conjunto de 146 cepas de *Y. pestis* e oito de *Y. pseudotuberculosis*. Todos os representantes de *Y. pestis* amplificaram e apresentaram os três locos, com exceção da cepa Angola, que embora tenha amplificado os locos YPb e YPc, apenas a repetição degenerada e a sequência Líder foram identificadas. Esta cepa apresenta particularidades relevantes quando comparadas com outras cepas de *Y. pestis*. Ela possui a capacidade de fermentar raminose e melibiose, uma propriedade, geralmente, associada a *Y. pseudotuberculosis*, além de seu cromossomo ser caracterizado por uma constituição genética

intermediária entre isolados de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Análises genótípicas e fenótípicas comprovaram que esta cepa pertence a uma das linhagens mais ancestrais de *Y. pestis* (Eppinger *et al.*, 2010).

As repetições diretas (DR) e degeneradas (DG) mostraram-se altamente conservadas nas cepas de *Y. pestis* estudadas, confirmando a homogeneidade destas sequências dentro de um grupo de cepas da mesma espécie. Para estudos de subtipagem intraespecífica, esta região não é a melhor escolha. Diante da dinâmica natural de aquisição de espaçadores, esta é a região alvo para estudos de subtipagem de cepas bacterianas. O arranjo dos espaçadores encontrado nas cepas dos focos do Brasil, permitiu observar uma diversidade genotípica nos locos YPa e YPb. Ao contrário no loco YPc, onde não foram observados inserções ou deleções, entretanto sua presença se mantém constante em todas as cepas de *Y. pestis*, inclusive na linhagem considerada mais ancestral (*Y. pestis* Angola).

Contrariamente ao que foi sugerido por Lillestol *et al.* (2006), a inatividade do loco CRISPR não está relacionada com a perda da sequência Líder. No caso do loco YPc das cepas estudadas, esta região se mantém presente e sua inatividade pode ser explicada pela possível interação com as proteínas Cas e a sequência Líder do loco. Embora encontremos as proteínas Cas próximas ao loco YPa, suas atuações parecem influenciar os três locos CRISPR. O conteúdo AT (Adenina-Timina) da sequência Líder do YPc mostrou-se menor que as dos demais locos, sugerindo que esta composição interfere na ação das proteínas Cas e na atividade deste loco. Até o momento, não está esclarecido o porquê da permanência do loco YPc nas cepas de *Y. pestis*.

A grande maioria das cepas isoladas dos focos de peste do Brasil apresentou um arranjo de espaçadores idêntico a CO92: YPa (a1a2a3a4a5a6a7a8); YPb (b1b2b3b4b5) e YPc (c1c2c3), que representa uma assinatura CRISPR para cepas do biovar *Orientalis*. Algumas particularidades foram identificadas, como inserção de espaçadores foco-específicos, adjacente a sequência Líder, e deleções dos espaçadores mais internos. Barroung & Hovarth (2009) sugerem que tais deleções ocorrem, provavelmente, pela recombinação homóloga entre as repetições CRISPR, que ajudam a limitar o tamanho do loco. Além disso, a exclusão dos espaçadores mais antigos, que apresentaram similaridade com

fagos encontrados no passado, permitiria a conservação dos espaçadores similares a vírus circulantes no ambiente.

Os representantes do biovar *Antiqua* não apresentaram conservação no arranjo dos espaçadores para o loco YPa, não sendo possível estabelecer uma assinatura CRISPR para este biovar. Enquanto, os locos YPb e YPc apresentaram uma maior frequência dos arranjos b1b2b3b4 e c1c2c3. Curiosamente, a cepa *Pestoides F* apresentou alterações nos três locos: YPa (a1a2a3a4a5a13); YPb (b1b2b9b10,b11,b12); YPc (c1c2c3c5c6), características também encontradas no trabalho de Pourcel *et al.* (2005). Este representante é considerado atípico e pertencente ao grupo *Pestoide*, isolado do foco de peste da Ásia Central. Estudos comprovaram que este grupo de cepas mostrou-se com propriedades genéticas, bioquímicas e virulentas diferenciadas das demais cepas de *Y. pestis* (Bearden *et al.*, 2009; Eppinger *et al.*, 2010).

Os espaçadores do biovar *Medievalis* foram idênticos nas cepas PKR684 e Harbin35: YPa (a1a2a3); YPb (b1b2b3b4) YPc (c1c2c3). Embora uma pequena amostragem deste biovar tenha sido analisada, parece ser esta a assinatura dos locos CRISPR nas cepas *Medievalis*. Curiosamente, a cepa P. Exu 16 (foco Triunfo, Pernambuco, Brasil, biovar *Orientalis*) compartilhou o mesmo arranjo de espaçadores do loco YPa da cepa KIM, pertencente ao biovar *Medievalis*. O loco YPb, desta cepa, apresenta um novo arranjo de espaçador, não coincidindo com nenhuma cepa analisada neste estudo. Bos *et al.* (2011) analisaram algumas regiões genômicas de cepas de *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis Pestoide* e *Microtus* e verificaram similaridades com alguns representantes do biovar *Medievalis*. Sugeriram que esta seja a estrutura genômica mais relacionada ao ancestral dos isolados de *Y. pestis*. Provas bioquímicas estão sendo conduzidas para elucidar esta questão.

A cepa 91001, representante do biovar *Microtus*, apresenta arranjo único dos espaçadores no loco YPa (a1a4a6) e compartilha, juntamente com as cepas dos biovars *Antiqua* e *Medievalis*, o mesmo arranjo no loco YPb. Interessantemente, esta cepa foi a única a apresentar um único espaçador no loco YPc (c1). As cepas representativas deste biovar já foram classificadas como *Medievalis*, embora demonstrassem diferenças genéticas, bioquímicas e

patogênicas. Observa-se que a estrutura genômica da cepa 91001 é altamente diferenciada das cepas CO92 e KIM, devido aos rearranjos mediados pelos elementos de inserção (Zhou *et al.*, 2004).

Nossa análise confirmou que as regiões CRISPR das cepas de *Y. pestis* abrigam espaçadores, que podem atuar contra elementos genéticos móveis. Dos novos espaçadores, 52% são idênticos a sequências de fago e 48% a sequências plasmídias e cromossomais. Além de envolvidos na defesa da bactéria contra a invasão de elementos virais, os novos espaçadores também desempenham o papel de interação com elementos móveis integrados ao genoma da *Y. pestis*. Este achado também foi observado no estudo da região CRISPR em *Pseudomonas aeruginosa* (Cady *et al.*, 2011).

A similaridade encontrada dos espaçadores (a93, a96, a102, a103) com plasmídios típicos de *Y. pestis*, pMT1 e pCD1, supõe-se que seja decorrente de possíveis incorporações dos plasmídios no genoma bacteriano. Leal-Balbino *et al.* (2004) sugerem que ocorram tais integrações em cepas brasileiras de *Y. pestis*. Estudos complementares são necessários para confirmar a integração dos plasmídios nestas cepas, identificando a presença de genes de virulência, específicos destes plasmídios, e verificando a expressão de tais genes. Desta forma, poderíamos provar a influência do sistema CRISPR/Cas na regulação gênica de *Y. pestis*.

Análise Epidemiológica em *Y. pestis*

Com base nos dados CRISPR, as 128 cepas do Brasil foram agrupadas em 24 genótipos (G1-G24). G1 agrupou o maior número de cepas, comportando-se como o genótipo mais prevalente e o responsável pela permanência das *Y. pestis* nestes focos. Os dados moleculares e evolutivos suportam a evidência histórica da disseminação de uma linhagem fundadora, reforçando a hipótese da entrada de um único clone no Brasil. Os demais genótipos revelam subpopulações distintas de *Y. pestis*, separadas geograficamente, que demonstram a microevolução da bactéria nestes ambientes.

De acordo com Zhou *et al.* (2004) e Li *et al.* (2008), a microevolução adaptativa promove uma diversificação de cepas de *Y. pestis* em genótipos principais e

secundários dentro dos focos enzoóticos. Os principais genótipos desempenham um papel crucial na manutenção da peste nestes focos, enquanto os genótipos secundários contribuem na interação equilibrada do ambiente - hospedeiro/reservatório - *Y. pestis*.

As variações genotípicas encontradas neste estudo são atribuídas aos eventos genéticos, anteriormente descritos (Pourcel *et al.*, 2005): 1. deleção aleatória de um ou mais espaçadores; 2. adição de novos espaçadores, de forma polarizada e próxima a sequência Líder. Entre os novos espaçadores inseridos, identificamos espaçadores Região-Específicos (*Region-Specific Spacers-RSS*) nas cepas de *Y. pestis* isoladas dos focos do Brasil. Acredita-se que os locos CRISPR representem uma memória histórica de exposição a agentes exógenos e manutenção ao ambiente, já que espaçadores novos são adquiridos mais recentemente, ao contrário dos espaçadores mais conservados e próximos a repetição degenerada que são considerados mais antigos.

As cepas obtidas de uma mesma região geográfica compartilharam o mesmo arranjo de espaçadores. Diante da eficiente correlação entre o arranjo dos espaçadores e distribuição geográfica, todos os isolados estudados foram agrupados adequadamente. Como em qualquer estudo biogeográfico, é necessário ampliar as informações relacionadas a outras variantes, como dados ecológicos e evolutivos, podendo ser facilitado utilizando a ferramenta CRISPR.

Alguns espaçadores novos são peculiares de alguns isolados: a89 foi identificado apenas no foco Ibiapaba – CE, entre roedores (*Necromys lasiurus*, *Calomys callosus*) e humano, e nos períodos de 1979 e 1986 (Tabela S1). O fato do espaçador a89 (G2) ter sido encontrado entre roedor e humano, sugere que seja um alvo envolvido na manutenção e disseminação da *Y. pestis* neste foco. O espaçador a90 (G7) foi distribuído no foco de Baturité – CE, em 1978 e entre o roedor (*Calomys callosus*) e humano. Curiosamente, este mesmo marcador foi identificado em uma cepa isolada de humano de 1979 no foco de Ibiapaba – CE. As regiões possuem proximidade territorial, dessa forma é possível que o hospedeiro humano tenha se deslocado entre os focos. Com a incorporação do espaçador b50 (G19), a90 foi reisolado após três anos (1982,

1983), na mesma região focal. Este espaçador b50 contribuiu para o ressurgimento do espaçador a90 neste foco.

Os demais espaçadores foram relacionados com um isolado cada, porém com características específicas: seis encontrados, exclusivamente, em humanos (a91, a92, a100, a104, b51, b54), quatro em pulga *Polygenis b. jordani* (a94, a95, a101, a102), 10 nos roedores: *Rattus rattus* (a24, a93, a96, a103), *Necromys lasiurus* (a36, a97, a98, a99, b53) e *Oryzomys subflavus* (b52). Estes espaçadores são considerados como marcadores de rastreamento de peste nestes respectivos hospedeiro-reservatórios.

Deleções também foram observadas nas cepas de *Y. pestis* do Brasil, em especial um grupo de isolados que sofreu uma grande exclusão de espaçadores (-a2a3a4a5a6a7). Curiosamente, a grande maioria isolada de humano e apenas uma de pulga (*Polygenis b. jordani*). Provavelmente, este evento tenha ocorrido por necessidade adaptativa e manutenção à célula hospedeira.

Dentre as 18 cepas de *Y. pestis* estrangeiras, quatro do biovar *Orientalis* compartilharam a mesma disposição dos locos CRISPR com isolados dos focos de peste do Brasil; reforçando a assinatura proposta para este biovar (a1a2a3a4a5a6a7a8; b1b2b3b4b5; c1c2c3). As demais cepas foram enquadradas em diferentes genótipos (G25, G26, G27, G28, G29, G30, G31, G32, G33, G34, G35), como consequência dos eventos de inserção e deleção/inserção exclusivos para cada cepa.

Polimorfismo e evolução CRISPR em *Y. pseudotuberculosis*

Yersinia pseudotuberculosis é considerada o representante ancestral da *Y. pestis*, que evoluiu tão recentemente e que ainda compartilha uma forte homologia com esta espécie. Poucos aspectos cromossômicos são conhecidos na diferenciação das cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* (Brubaker, 2000; Radnedge *et al.*, 2002). Entretanto, comparações entre os cromossomos da IP32953, CO92 e KIM10+ revelaram várias diferenças entre as espécies. Provavelmente, os elementos de inserção e os rearranjos genéticos

subsequentes tenham desempenhado um papel importante no surgimento da *Y. pestis* (Chain *et al.*, 2004).

Neste estudo dos locos CRISPR, alguns elementos são compartilhados entre *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. As DRs foram idênticas nas duas espécies, mantendo-se conservada no gênero *Yersinia*. Os três locos estavam presentes na grande maioria dos isolados, exceto nos IP31553 e IP32950, que não amplificaram o loco IPa e não possuem o conjunto repetição-espaçador do IPb. Interessantemente, as cepas IP32952 e IP32944 compartilharam espaçadores nos três locos já descritos em *Y. pestis*, exemplificando a proximidade genética destes isolados de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*.

Um grande polimorfismo foi observado nos locos IPa e IPc, com alelos muito maiores do que os observados na *Y. pestis*. Similarmente, em *Mycobacterium canettii*, considerado ancestral de *M. tuberculosis*, mais de 50 espaçadores descritos não foram encontrados em *M. tuberculosis* (Van Embden *et al.*, 2000; Fabre *et al.*, 2004). O elevado número de alelos CRISPR também foi encontrado em *Campylobacter jejuni* (Schouls *et al.*, 2003).

Diante da baixa variabilidade observada nos locos IPb de *Y. pseudotuberculosis* e nenhuma no YPc de *Y. pestis*, pode-se questionar uma possível correspondência ou translocação entre eles. Entretanto, não foi identificada semelhança entre as repetições degeneradas, regiões flaqueadoras e sequência Líder destes locos, que justificasse este evento entre as espécies.

A grande diversidade de espaçadores observada em *Y. pseudotuberculosis* não permitiu estabelecer um arranjo padrão de espaçadores. Curiosamente, esta diversidade parece não ter sido adquirida exclusivamente por exposição a fagos, visto a baixa frequência de similaridade com estes organismos. Em contrapartida, *Y. pestis* apresenta uma maior frequência desta similaridade, reforçando que esta espécie parece sofrer uma maior pressão de permanência em seu respectivo nicho ecológico.

Embora *Y. pestis* tenha surgido recentemente da *Y. pseudotuberculosis*, a diversidade de espaçadores foi menor. Análises de sequências repetitivas (VNTR's) também revelaram uma maior heterogeneidade em representantes de *Y. pseudotuberculosis* (dados não publicados). Dessa forma, parece que as

diferenças genéticas entre *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* concentram-se na recombinação de elementos de inserção, acúmulo de pseudogenes e diferenças nestas regiões de DNA repetitivo. Hinchliffe *et al.* (2003) reforçam que apenas as análises das regiões adquiridas, durante o surgimento da *Y. pestis*, não promovem um esclarecimento das diferenças entre as duas espécies, porém estudos sobre a aquisição de sequências relacionadas ao fago podem ser significativos.

Quanto à evolução da sequência Líder nas cepas de *Y. pseudotuberculosis*, IPa e IPc se mostraram muito similares aos locos YPa e YPc em *Y. pestis*. Diferentemente do IPb, que gerou um grupo único e distante da sequência Líder do YPb da *Y. pestis*. É possível que este loco CRISPR tenha surgido de forma independente entre as duas espécies. Poucos estudos estão voltados para esta região do loco CRISPR, principalmente nesta esfera evolutiva, o que dificulta uma análise mais detalhada.

O presente trabalho forneceu dados significativos da diversidade dos locos CRISPR em um grupo intraespecífico de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Os achados confirmam uma única entrada clonal de cepas de *Y. pestis*, como fundadora e responsável pela disseminação da bactéria, além de genótipos exclusivos, importantes na permanência dos focos de peste no Brasil. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para esclarecer alguns questionamentos funcionais e evolutivos destes locos nas espécies de *Yersinia*.

REFERÊNCIAS

Abadia, E., Zhang, J., Ritacco, V., Kremer, K., Ruimy, R., Rigouts, L., Gomes, H.M., Elias, A.R., Fauville-Dufaux, M., Stoffels, K. & other authors (2011). The use of microbead-based spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex to evaluate the quality of the conventional method: providing guidelines for Quality Assurance when working on membranes. *BMC Infect Dis* **11**, 110.

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 USA* **96**, 14043-14048. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 8192.

Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vogler, A.J., Wagner, D.M., Allender, C.J., Easterday, W.R. & other authors (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 17837-17842.

Al-Attar, S., Westra, E.R., van der Oost, J. & Brouns, S.J. (2011). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem* **392**, 277-289.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Andersson, A.F. & Banfield JF. (2008). Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* **320**, 1047-1050.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712.

Barrangou, R. & Horvath, P. (2009). The CRISPR System Protects Microbes against Phage, Plasmids. *Microbe* **4**, 224-230.

Barrangou, R. & Horvath, P. (2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol* **3**, 143-162.

Barros, M.P.S., Silveira-Filho, V.M., Lins, R.H.F.B., Oliveira, M.B.M., Almeida, A.M.P. & Leal-Balbino, T.C. (*in press* 2012). Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genet Mol Res in press* 2012.

Bearden, S.W., Sexton, C., Pare, J., Fowler, J.M., Arvidson, C.G., Yerman, L., Viola, R.E. & Brubaker, R.R. (2009). Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. *Microbiology* **155**, 198-209.

Brubaker, R. R. (2000). *Yersinia pestis* and bubonic plague. In *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin and others. New York: Springer (Online).

Cady, K.C., White, A.S., Hammond, J.H., Abendroth, M.D., Karthikeyan, R.S., Lalitha, P., Zegans, M.E. & O'Toole, G.A. (2011). Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology* **157**, 430-437.

Chain, P.S., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O., Regala, W.M., Georgescu, A.M., Vergez, L.M., Land, M.L., Motin, V.L. &

other authors (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 13826-13831.

Cui, Y., Li, Y., Gorgé, O., Platonov, M.E., Yan, Y., Guo, Z., Pourcel, C., Dentovskaya, S.V., Balakhonov, S.V., Wang, X. & other authors (2008). *PLoS One* **3**, e2652.

Devignat, R. (1951). Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. *Bulletin de l'organazition Mondial de la Santé* **4**, 247- 263.

Eppinger, M., Worsham, P.L., Nikolich, M.P., Riley, D.R., Sebastian, Y., Mou, S., Achtman, M., Lindler, L.E. & Ravel, J. (2010). Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. *J Bacteriol* **192**, 1685-1699.

Fabre, M., Koeck, J.L., Le Flèche, P., Simon, F., Hervé, V., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2004). High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". *J Clin Microbiol* **42**, 3248-3255.

Garrett, R.A., Vestergaard, G. & Shah, S.A. (2011). Archaeal CRISPR-based immune systems: exchangeable functional modules. *Trends Microbiol* **19**, 549-556.

Guiyole, A., Grimont, F., Itean, I., Grimont, P.A., Lefèvre, M. & Carniel, E. (1994). Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol* **32**, 634-641.

Hale, C.R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M.O., Graveley, B.R., Wells, L., Terns, R.M. & Terns, M.P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* **139**, 945-956.

Hinchliffe, S.J., Isherwood, K.E., Stabler, R.A., Prentice, M.B., Rakin, A., Nichols, R.A., Oyston, P.C., Hinds, J., Titball, R.W. & Wren, B.W. (2003). Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res* **13**, 2018-2029.

Horvath, P., Romero, D.A., Coûté-Monvoisin, A.C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**, 1401-1412.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**, 5429-5433.

Jansen, R., Embden, J.D., Gastra, W. & Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* **43**, 1565-1575.

Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J. & Hugh-Jones, M.E. (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.

Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Lopes, C.G.V. & Almeida, A.M.P. (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 727-732.

Li, Y., Dai, E., Cui, Y., Li, M., Zhang, Y., Wu, M., Zhou, D., Guo, Z., Dai, X., Cui, B. & others authors (2008). Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One* **3**, e2166.

Lillestol, R.K., Redder, P., Garrett, R.A. & Brügger, K. (2006). A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* **2**, 59-72.

Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Kolodkina, V., Limeschenko, E., Titov, L. & Narvskaya, O. (2009). Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 701-703.

Motin, V.L., Georgescu, A.M., Elliott, J.M., Hu, P., Worsham, P.L., Ott, L.L., Slezak, T.R., Sokhansanj, B.A., Regala, W.M., Brubaker, R.R. & others authors (2002). Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J Bacteriol* **184**, 1019-1027.

Nozawa, T., Furukawa, N., Aikawa, C., Watanabe, T., Haobam, B., Kurokawa, K., Maruyama, F. & Nakagawa, I. (2011). CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* **6**, e19543.

Oliveira, M.B.M., Barros, M.P.S., Silveira-Filho, V.M., Araújo-Nepomuceno, M.R., Balbino, V.Q., Leal, N.C., Almeida, A.M.P. & Leal-Balbino, T.C. (*in press* 2012). The Genetic Diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet Mol Res in press* 2012.

Palmer, K.L. & Gilmore, M.S. (2010). Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio* **1**, e00227-10.

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.

Radnedge, L., Agron, P.G., Worsham, P.L. & Andersen, G.L. (2002). Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology* **148**, 1687-1698.

Rezzonico, F., Smits, T.H. & Duffy, B. (2011). Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3819-3829.

Riehm, J.M., Vergnaud, G., Kiefer, D., Damdindorj, T., Dashdavaa, O., Khurelsukh, T., Zöller, L., Wölfel, R., Le Flèche, P. & Scholz, H.C. (2012). *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One* **7**, e30624.

Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J.A., Willems, R.J., Dingle, K.E., Colles, F.M. & Van Embden, J.D. (2003). Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):15-26.

Skurnik, M., Peippo, A. & Ervelä, E. (2000). Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**, 316-330.

Stenseth, N.C., Atshabar, B.B., Begon, M., Belmain, S.R., Bertherat, E., Carniel, E., Gage, K.L., Leirs, H. & Rahalison, L. (2008). Plague: past, present, and future. *PLoS Med* **5**, e3.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.

Vallone, P.M. & Butler, J.M. (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques* **37**, 226-231.

Van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B.A. & Schouls, L.M. (2000). Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* **182**, 2393-2401.

Zhou, D., Tong, Z., Song, Y., Han, Y., Pei, D., Pang, X., Zhai, J., Li, M., Cui, B., Qi, Z. & others authors (2004). Genetics of metabolic variations between

Yersinia pestis biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J Bacteriol* **186**, 5147-5152.

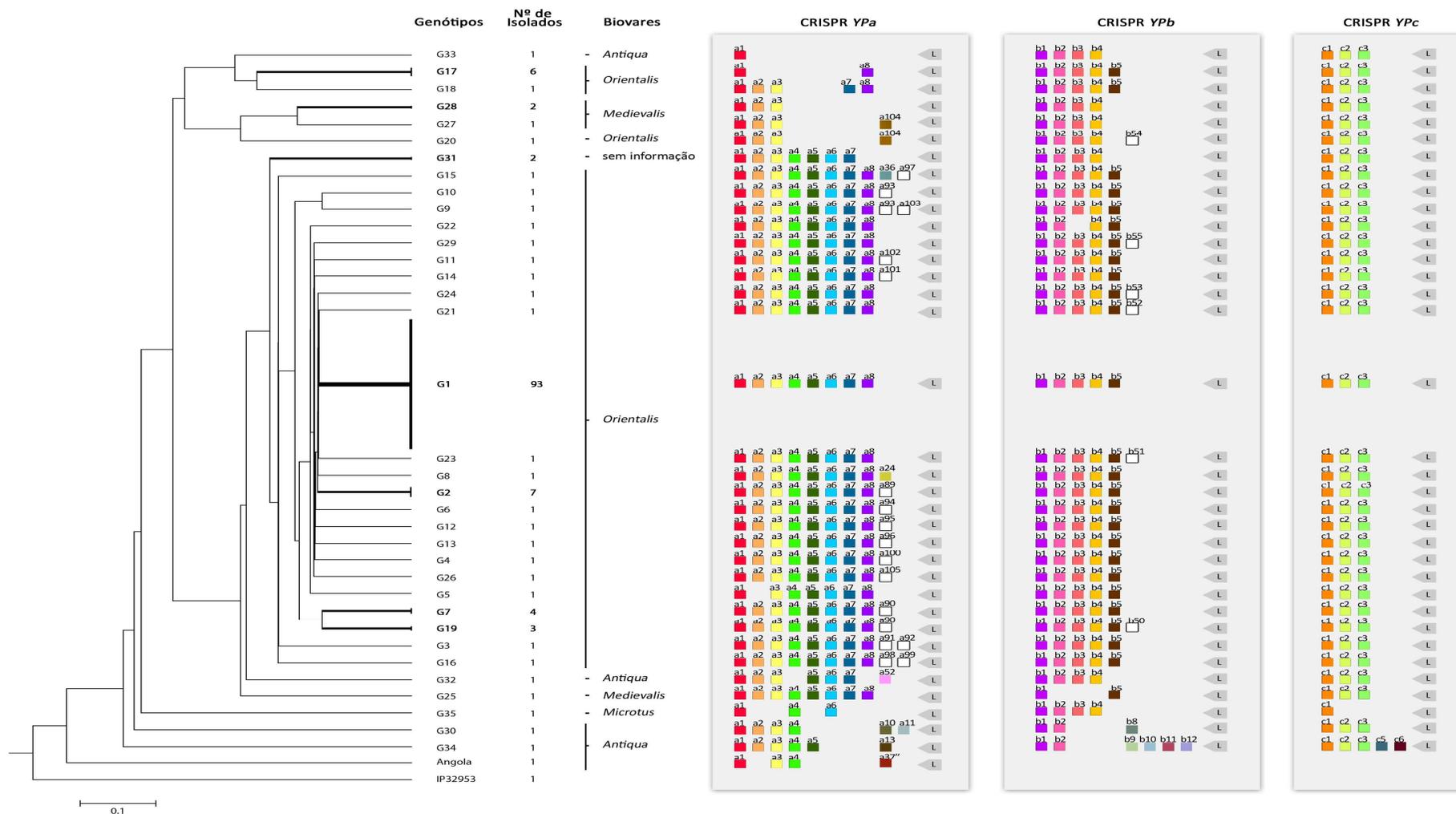


Fig. 1. Representação do agrupamento das cepas de *Yersinia pestis*, de acordo com os arranjos de espaçadores dos três locos CRISPR. A cepa Angola não possui genótipo, pois não apresenta os locos YPb e YPc. IP32953 utilizado como grupo externo. Boxes coloridos, espaçadores já descritos. Boxes brancos, espaçadores novos. L: Sequência Líder.

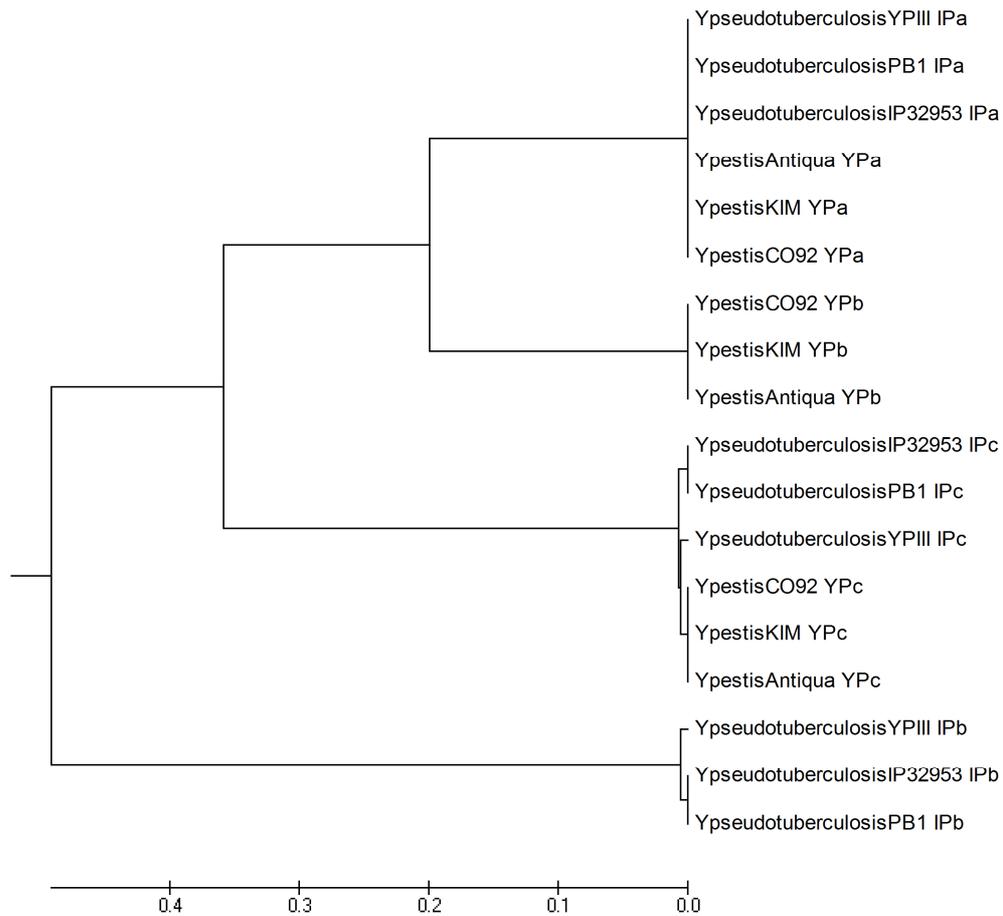


Fig. 2. Dendrograma gerado a partir do alinhamento das seqüências Líder dos locos CRISPR de cepas de *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*.

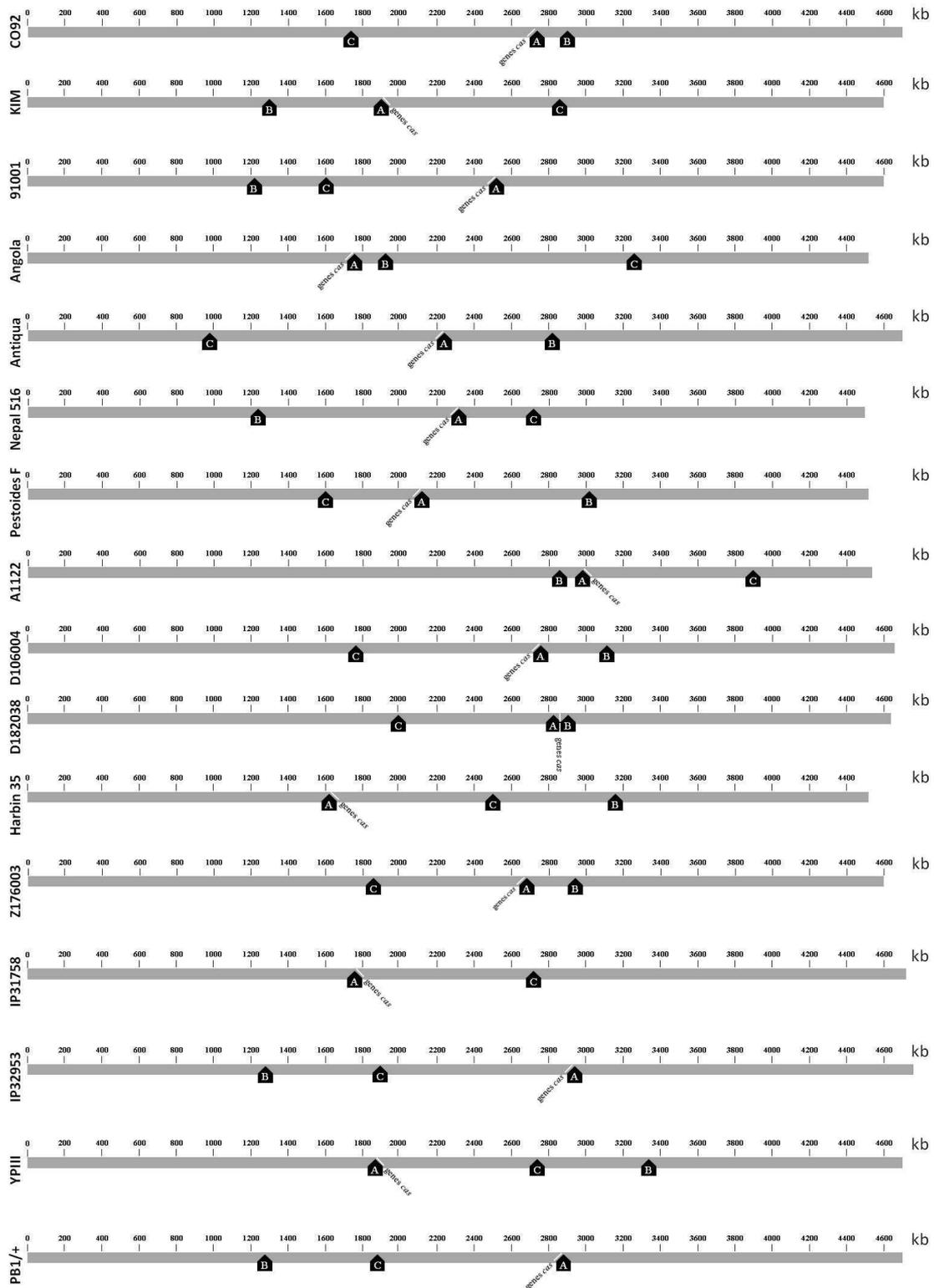


Fig.3. Esquema representativo da localização dos três locos CRISPR e genes cas em cepas de *Yersinia pestis* (CO92, KIM, 91001, Angola, Antiqua, Nepal516, Pestoide F, A1122, D106004, D182038, Harbin 35, Z176003) e *Yersinia pseudotuberculosis* (IP31758, IP32953, YPIII, PB1/+).

Tabela 1. Caracterização dos novos espaçadores em *Yersinia pestis*.

Espaçador	Sequências	Gene correspondente	Produto
a89	TTTTGCATTTGGATTCTCCTTGAATGCCTCACT	YPO2125	Proteína Regulatória de Fago
a90	CAGCCAGATAGCCGTTTTTCACAGTATTGATA	YPO2108	Proteína Hipotética de Fago
a91	AGATCATGGGGCCGAGTTAGAACATCAAACAT	23S da <i>Y. enterocolitica</i>	rRNA Intergênica 23S
a92	ATAGGCATAGCACCGAGGCGGCGGAAAACAG	YPO3683; YPO2410	Regulador Transcricional
a93	AGGTGCAACAGGGACTTTAGGATAGAAAAGTCC	dominio catalitico da fosfolipaseD	Região do plasmídeo pMT1
a94	ACTTAGGGACATTAGCTTGGGATGTGAAACAG	YPO3681	Toxina bacteriana
a95	GTGTGGGTTTTGACATCCAACAACCTGCCAAAT	YPO3722	Metiltransferase
a96	AAGCTAAAGGCCCGCCGTTTGTGGTGGTACCA	pMT1	Região do plasmídeo pMT1
a97	ATGTAGTTCCCGCTGGAACCTGTCCATCCATA	YPO2108	Proteína Hipotética de fago
a98	CCTTTCCCAGTAGAGCTGAACCATCTTTATCA	YPO2109	Proteína Hipotética de fago
a99	GTTTGCTACCATCACCGCCAGTAGTGTATCCC	YPO1270	Proteína transportadora ABC
a100	CTTGACCCTCAAATTGAGTGTAAGGGGTTTGG	YPO2093	Proteína Putativa de fago
a101	GGTAAGCTCTGCATTTAACGCTGTTTCGACGG	YPO1561; YPO1562	Transposase
a102	TGTTTCCACGTTGCAATTTTCCACCATGCTTA	pCD1	Região plasmidial pCD1
a103	ATTGATGACTAGAATACTAGTAAGTAATAAC	dominio catalitico da fosfolipaseD	Região do plasmídeo pMT1
a104	GCTCTGCGTCACTCTCATTGAGCACTTTAACC	YPO2108	Proteína Hipotética de fago
b50	TGCGCCATTGGCGTTGGTTTTTCAGGTATTCCAG	YPO2103; YPO2106	Proteína do Fago
b51	GAAAGAATAAGGATTTATAATTTATGACCACA	YPO2109; YPO2110	Proteína Hipotética de fago
b52	ACCAAGCGGAACTGCCTCAAAGCACCGGTTA	YPO2103	Terminase de Fago
b53	GTGGCGATAAACTTAAGCTGGGTCAAGATTAT	YPO2095; YPO2096	Proteína Hipotética de Fago
b54	GCATAACCGCCGAGGACGCTGTAAATACTTT	YPO2114; YPO2115	Proteína Hipotética de fago

Tabela 2. Caracterização dos novos espaçadores em *Yersinia pseudotuberculosis*.

Cepa	Sorotipo	Fonte de isolamento	Espaçador	Sequência	Produto			
IP32944	III	Bovino	IPa92	CGTCCCCTTTTTGCAGATCTGCAAATTAAGT	Regulador transcricional			
			IPa93=a62	CGTGATTGGCCACTTGGCTGAGAATGATGTCA	Nenhuma similaridade			
			IPa94=a64	TTATCGGGGTCGGTTGCATCACTAATGACATT	Nenhuma similaridade			
			IPa95=a1	TCAGGGGACTGGCGAACAATGTCTTTCATGAT	Nenhuma similaridade			
			IPa96=a2	GAAAAGGTAAGATGGCAAGCTTAGTAGT	Nenhuma similaridade			
			IPa97=a3	ATTATCTGAATGGCATTTCCTTTGGCGCAGAT	Nenhuma similaridade			
			IPa98	GAAAAACATCTTCCATTACCTTATATTACAGTG	Nenhuma similaridade			
			IPa99	GAAAACGTTCTACAGTTTATTGAGTCTGTAA	Exodeoxyribonuclease I			
			IPa100	TGAGCCATTTGATTAGATGGATTATATAATCT	Nenhuma similaridade			
			IPa101	AATCTTTCTTTATGATAAAAATTGTATTGAGA	Nenhuma similaridade			
			IP32952	IV	Humano	IPa102	ACACGCCAACACTGACTTGCACCGTGCCTCGTG	Frutoquinase
						IPa103	ACACGCTCTGGCGTTTCATTTTTGGCGTCCT	Nenhuma similaridade
						IPa104	CATAGAAGCATTATTAACCTTTCGCGATAATCAG	pGDT4
						IPa105	TTCCCAAAATGACTTATCCACATATCTACA	Nenhuma similaridade
						IPa106	TCTACAGGATTGTTTTTAATGCTTTTTATTT	Nenhuma similaridade
						IPa107	TCTATCAGGTCGCTTTCCTCTTGTGTCAGAGG	Nenhuma similaridade
						IPa108	AGTTGAGAGGCCATCAAGCCAACCAACGAAAC	Nenhuma similaridade
						IPb3=b15	ACTTTAATCAATCCATCGCGCATAGCTGACC	Nenhuma similaridade
IPb4=b16	GTGCAGCTCCGCGCCGTTGCTCAACACAATAG	Proteína desconhecida						
IPb5=b17	TATTGATGTAAGTGCGGCACCGGATATCGAGT	Proteína do fago (YPO2134)						
IPb6=b18	TGGACGTTATCGAAGCTAAGAATTTGCTGGC	Nenhuma similaridade						
IPb7=b19	TAGCAATGTTCAAACAGGGTTAATGCCTTTT	Nenhuma similaridade						
IPb8=b20	ACTGAAACCTGCAATAAATAACTCTCGAGTT	Nenhuma similaridade						
IP32944	III	Bovino	IPb9=b14	CTGAGTAAAGAAGAAATTCAGGAAATGATAGT	Nenhuma similaridade			
			IPc70	AAAAACCGACAGAGAGTCTGTATTAATCGTAC	Nenhuma similaridade			
			IPc71	ATAATATGATTCCTTTTATACCGTTATTAATG	Proteína Conservada			
			IPc72	ATGAAATTAATATCTTCTATTGTTCTGACTACT	Nenhuma similaridade			
			IPc73	CTCGTATGCGTCGCGCATTTATCGATAATGAT	Proteína Cas1			
			IPc74	GCGGGCTTTATATCCTCAAACACCTGCAACGT	Nenhuma similaridade			
			IP31553	VI	Roedor	IPc75	CTGCCCGCTGGGGGCAAGGTTGTGAGCAGCT	Nenhuma similaridade
						IPc76	ATGGGGATGACCGTCTGTCCCTTGTGCTCGGT	Nenhuma similaridade
						IPc77	ACGATGAGCAGGCTTATAAGCTTTGCCTGCTA	Nenhuma similaridade
						IPc78	TCTTTAACCAGAAAATAGCGGATGTGGCATCA	Nenhuma similaridade
IPc79	ATAATAAATGAAATAATCCGCGCGTCAATTAG	Exodeoxyribonuclease I						
IPc80	GTTGACAGTACCAGCAATAATCTGTATTCCAAG	Nenhuma similaridade						
IP32944	III	Bovino	IPc81	ACATCGTGAAGATTAACACAGTTTCTAGTGT	Nenhuma similaridade			
			IPc82=c8	TAACGTCGTTAATTCTAGCCAATCGCCATTT	Nenhuma similaridade			
IP32950	I	Humano	IPc83	GGTGACTATTCAATCGGCACGTGAGCAAAACAT	Nenhuma similaridade			
			IPc84	CTCGGCCTCATTATCCTTTTCGATAATCTCCG	Nenhuma similaridade			
			IPc85	AAGATTAGCATTAGCCAATGCAAGTCCCGACT	Nenhuma similaridade			
IP32952	IV	Humano	IPc86=c1	GTTATACCCCGCGCAGGGAGTGAAGCGTTGAC	Nenhuma similaridade			
			IPc87	TTAAGTTCTTGTGTCAGCATCGGTAATAAAT	Exodeoxyribonuclease I			
			IPc88=c3	CTGAAATACAAATAAATAAATCGTGAACAT	Nenhuma similaridade			
			IPc89	GTAAGATAATACGGATAACCCGATG	Exodeoxyribonuclease			

Tabela S1. Características das cepas *Yersinia pestis* estudadas

Cepas dos focos do Brasil

Cepa	Ano de Isolamento	Foco	Fonte	Município/Estado	Sítio/Fazenda	Biovar	YPa	YPb	YPc	Perfil Genotípico
P. CE 01	1978	Ibiapaba	Humano	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 03	1979	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	Ipu-CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 09	1980	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 11	1982	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 13	1982	Baturité	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 14	1982	Ibiapaba	<i>Pulex irritans</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 18	1982	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 19	1982	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 21	1982	Ibiapaba	Humano	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 24	1982	Baturité	<i>Rattus rattus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 882	1997	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 12	1966	Araripe	<i>Oryzomys eliurus</i>	Exu-PE	Serra Manoel Severino	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 19	1967	Araripe	<i>Oryzomys subflavus</i>	Exu-PE	Alto	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 241	1968	Araripe	<i>Rattus rattus (Rra)</i>	Exu-PE	Gadella	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 365	1970	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Espalhado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 374	1970	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Cacimbas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 375	1970	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Espalhado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 377	1970	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Espalhado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 430	1971	Araripe	<i>Oryzomys subflavus</i>	Exu-PE	Pamonha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 509	1971	Ibiapaba	Humano	Guaraciaba do Norte-CE	Timbauba	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 527	1971	Ibiapaba	Humano	Guaraciaba do Norte-CE	Burití Apuá	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 538	1971	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Mato Grosso	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 540	1971	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Povoado América	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 542	1971	Ibiapaba	Humano	Guaraciaba do Norte-CE	Lagoa do Firmino	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 554	1971	Ibiapaba	Humano	São Benedito-CE	Pimenteira	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 556	1972	Ibiapaba	Humano	Guaraciaba do Norte-CE	São Felix	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 558	1972	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Macambira	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 617	1974	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Se. Pau Casado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 715	1974	Araripe	Humano	Exu-PE	Alto do Ferreira	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 718	1974	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	São Luiz	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 720	1974	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Barro	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 738	1975	Araripe	Humano	araripe-PE	Cansação	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 791	1978	Triunfo	<i>Necromys lasiurus</i>	Triunfo-PE	Barbalho	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 792	1978	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Cabeça Dantas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 798	1978	Triunfo	<i>Necromys lasiurus</i>	Triunfo-PE	S. José dos Pilotos	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 799	1978	s/i	Roedor (s/i)	Serrinha-BA	Flores	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 801	1978	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Tabocal	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 822	1979	Triunfo	<i>Oryzomys subflavus</i>	Triunfo-PE	Lagoa do Almeida	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 835	1979	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	Ipu-CE	Taboca	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 861	s/i	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	Ipu-CE	Grossos	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 862	1986	Borborema	Humano	Solânea-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 864	1986	Borborema	<i>Rattus rattus (Rrf)</i>	Solânea-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1

P. PB 867	1986	Borborema	<i>Necomys lasiurus</i>	Solâne-PB	Lagoa do Serrote	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 868	1986	Borborema	<i>Necomys lasiurus</i>	Solâne-PB	Cinco Estrelas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 869	1986	Borborema	<i>Holochilus sciureus</i>	Solâne-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 870	1986	Borborema	<i>Necomys lasiurus</i>	Solâne-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 871	1986	Borborema	<i>Necomys lasiurus</i>	Solâne-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 872	1986	Borborema	<i>Necomys lasiurus</i>	Solâne-PB	Cinco Lagoas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 873	1986	Borborema	<i>Oryzomys subflavus</i>	Solâne-PB	Cinco Lagoas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 874	1986	Borborema	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Solâne-PB	Bacalhau	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 877	1986	Borborema	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Solâne-PB	Cinco Lagoas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 878	1986	Borborema	<i>Oryzomys subflavus</i>	Solâne-PB	Bacalhau	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 879	1986	Borborema	<i>Oryzomys subflavus</i>	Solâne-PB	Pedra d'Água	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 880	1986	Borborema	<i>Oryzomys subflavus</i>	Solâne-PB	Bacalhau	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. PB 881	1986	Borborema	Humano	Remígio-PB	Serrinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 30 (2s)	1967	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 31 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 39(2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 42 (1s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 42 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 47 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 48 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 53 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 57 (1s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 57 (2s)	1967	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 60 (1s)	1967	Araripe	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 60 (2s)	1967	Araripe	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 74 (2s)	1967	Araripe	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 15	1966	Araripe	Humano	Exu-PE	Retiro	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 185	1967	Borborema	Humano	Caruaru-PE	Lagoa do Anjo	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 246	1968	Araripe	Humano	Araripina-PE	Cascavel	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 276	1968	Araripe	Humano	Bodocó-PE	Queimada	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 292	1968	Triunfo	Humano	São José do Belmonte-PE	Mata Redonda	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 312	1969	Araripe	Humano	Exu-PE	Badreci	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 363	1970	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Cacimbas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 373	1970	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Cacimbas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 384	1970	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Oriente	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 459	1971	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Aracajú	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 602	1974	Araripe	<i>Necomys lasiurus</i>	Exu-PE	Serra Pau Casado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 623	1974	Araripe	Roedor (gsw)	Exu-PE	Serra Pau Casado	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 769	1975	Araripe	Humano	Ipubi-PE	Cacimbinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 771	1975	Araripe	Humano	Araripina-PE	Serra Antônio Domingos	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 778	1975	Araripe	Humano	Araripina-PE	Cavaco	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 781	1975	Araripe	Humano	Granito-PE	Catumbi	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 788	1977	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Araripina-PE	Alto Alegre	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 793	1978	Triunfo	<i>Necomys lasiurus</i>	Triunfo-PE	Jericó	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 813	1979	Triunfo	<i>Necomys lasiurus</i>	Triunfo-PE	Salgada	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1

P. Exu 825	1979	Borborema	<i>Polygenis b. jordani</i>	Tacaimbó-PE	Malhada do Juá	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. Exu 827	1979	Borborema	<i>Polygenis b. jordani</i>	São Caetano-PE	Campo Alegre	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
P. CE 04	1979	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. CE 05	1979	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	Guaraciaba do Norte-CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. CE 06	1979	Ibiapaba	Roedor (s/i)	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. CE 07	1979	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. CE 30	1986	Ibiapaba	<i>Calomys callosus</i>	CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. Exu 789	s/i	Ibiapaba	Humano	Guaraciaba do Norte-CE	São Felix	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. Exu 842	s/i	Ibiapaba	<i>Necromys lasiurus</i>	Guaraciaba do Norte-CE	São Felix	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a89	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G2
P. Exu 184	1967	Araripe	Humano	Exu-PE	Serra Jatobá	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a91a92	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G3
P. Exu 334	1969	Araripe	Humano	Exu-PE	Gambá	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a100	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G4
P. Exu 340	1969	Araripe	Humano	Ipubi-PE	Se. Anastácio Barbosa	<i>Orientalis</i>	a1a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G5
P. Exu 787	1976	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE		<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a94	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G6
P. Exu 795	1978	Baturité	Humano	Aratuba-CE	Serrinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G7
P. Exu 796	1978	Baturité	Humano	Aratuba-CE	Serrinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G7
P. Exu 806	1978	Baturité	<i>Calomys callosus</i>	Aratuba-CE	Fernandes	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G7
P. Exu 809	1979	Ibiapaba	Humano	Ipu-CE	Macaco	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G7
P. Exu 797	1978	Ibiapaba	<i>Rattus rattus</i>	Ipu-CE	Almas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a24	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G8
P. PB 866	1986	Borborema	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Solânea-PB	Valério	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a93a103	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G9
P. PB 876	1986	Borborema	<i>Rattus rattus(Rrf)</i>	Solânea-PB	Cinco Lagoas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a93	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G10
P. Exu 36 (2s)	1967	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a102	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G11
P. Exu 44 (1s)	1967	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a95	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G12
P. Exu 54 (2s)	1967	Araripe	<i>Rattus rattus(Rra)</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a96	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G13
P. Exu 59 (2s)	1967	Araripe	<i>Polygenis b. jordani</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a101	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G14
P. Exu 61 (2s)	1967	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a36a97	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G15
P. Exu 67 (2s)	1967	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Alagoinha	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a98a99	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G16
P. Exu 17	1966	Triunfo	Humano	Triunfo-PE	Santa Clara	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 248	1968	Triunfo	Humano	São José do Belmonte-PE	Baixa verde	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 249	1968	Triunfo	Humano	São José do Belmonte-PE	Bananeira 2º	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 351	1969	Triunfo	Humano	Triunfo-PE	Batinga	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 674	1974	Araripe	Humano	Exu-PE	Brejo Santo Inácio	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 832	1979	Borborema	<i>Polygenis b. jordani</i>	Tacaimbó-PE	Paulista	<i>Orientalis</i>	a1a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G17
P. Exu 387	1970	Araripe	<i>Necromys lasiurus</i>	Exu-PE	Oriente	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G18
P. CE 17	1982	Baturité	<i>Necromys lasiurus</i>	Aratuba-CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5b50	c1c2c3	G19
P. CE 25	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5b50	c1c2c3	G19
P. CE 28	1983	Baturité	Roedor (s/i)(nl ou gsw)	Mulungu-CE	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a90	b1b2b3b4b5b50	c1c2c3	G19
P. Exu 16	1966	Triunfo	Humano	São José do Belmonte-PE	Minador	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a104	b1b2b3b4b54	c1c2c3	G20
P. Exu 03	1966	Araripe	<i>Oryzomys subflavus</i>	Exu-PE	Serra Mundo Novo	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5b52	c1c2c3	G21
P. Exu 803	1978	Ibiapaba	Humano	São Benedito-CE	Carnaúba	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b4b5	c1c2c3	G22
P. Exu 845	1980	Araripe	Humano	Ipubi-PE	Baixas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5b51	c1c2c3	G23
P. PB 865	1986	Borborema	<i>Necromys lasiurus</i>	Solânea-PB	Cinco Lagoas	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5b53	c1c2c3	G24

Cepas de outros focos de peste

Cepa	Ano de Isolamento	Foco	Fonte	Biovar	YPa	YPb	YPc	Perfil Genotípico
PKOL	s/i	Curdistão	Humano	<i>Medievalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b5	c1c2c3	G25
ALEXANDER	s/i	EUA	Humano	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8a105	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G26
KIM	s/i	Irã	Humano	<i>Medievalis</i>	a1a2a3a104	b1b2b3b4	c1c2c3	G27
PKR684	s/i	Irã	Roedor	<i>Medievalis</i>	a1a2a3	b1b2b3b4	c1c2c3	G28
PERU	1995	Peru	Humano	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5b55	c1c2c3	G29
PB8	s/i	Birmânia	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
PBM5	s/i	Birmânia	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
EV76	1926	Madagascar	Humano	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
A1122	s/i	s/i	s/i	<i>Orientalis</i>	a1a2a3a4a5a6a7a8	b1b2b3b4b5	c1c2c3	G1
Angola	1985	s/i	s/i	<i>Antiqua</i>	a1a3a4a37"			
Antiqua	1965	RDCongo	Humano	<i>Antiqua</i>	a1a2a3a4a10a11	b1b2b8	c1c2c3	G30
D106004	2006	Yulong County	Roedor	<i>s/i</i>	a1a2a3a4a5a6a7	b1b2b3b4	c1c2c3	G31
D182038	1982	Yunnan	Roedor	<i>Antiqua</i>	a1a2a3a5a6a7a52	b1b2b3b4	c1c2c3	G32
Nepal516	1967	Nepal	Humano	<i>Antiqua</i>	a1	b1b2b3b4	c1c2c3	G33
Pestoide F	s/i	Russia	Roedor	<i>Antiqua</i>	a1a2a3a4a5a13	b1b2b9b10b11b12	c1c2c3c5c6	G34
Z176003	1976	Tibet	Roedor	<i>Antiqua</i>	a1a2a3a4a5a6a7	b1b2b3b4	c1c2c3	G31
Harbin 35	s/i	China	Humano	<i>Medievalis</i>	a1a2a3	b1b2b3b4	c1c2c3	G28
91001	s/i	China	s/i	<i>Microtus</i>	a1a4a6	b1b2b3b4	c1	G35

Normas da revista *Microbiology*

General information

All papers must be submitted online, via the Bench>Press system (use the Submit a Manuscript link). Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Bench>Press site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Bench>Press site.

Pre-submission checklist

Authors must:

1. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;
2. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
3. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
4. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
5. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be entered in the Contents Category field of the online submission form in Bench>Press);
6. include on the title page the word count of both the summary and the main text (including the figure and table legends, in-text citations and any appendices, but not including the title page, acknowledgements, table bodies and footnotes, or reference list) and the number of tables and figures;
7. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
8. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
9. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;
10. upload cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s);
11. include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) if the paper reports new sequence data; the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

Note that research papers with more than 5500 words and 8 figures and tables combined will be subject to a length charge.

Preparing files for submission

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. The submission system will also attempt to prepare an HTML version of the reference list with links to papers that it can identify on the PubMed and HighWire databases, for use by the reviewers. This conversion will not work reliably if the reference format is incorrect (see the the section on References for the correct style); however, an HTML reference list is not essential for review

of the paper to proceed. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

Submission as a single PDF. Please refer to the Help pages on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

Submission as separate word-processor and image files. Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the Help with Online Submission pages for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Bench>Press system as part of an initial submission, as set out in the Files for Publication section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

General style and layout

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense, and should normally comprise: (a) Title page; (b) Summary; (c) Introduction; (d) Methods; (e) Results; (f) Discussion, with Conclusions if appropriate; (g) Acknowledgements; (h) References; (i) Tables; (j) Figures, with legends. A Theory section and Appendices may be included. Where appropriate, the Results and Discussion may be combined. Figures and tables

should only be used to illustrate points that cannot easily be described in the text. Note that a length charge is applied to papers with more than 5500 words and/or 8 figures and tables combined. Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

Title Page

This should carry the following information.

- The title of the paper. A good title is very important. It will attract readers and facilitate retrieval by online searches, thereby helping to maximize citations. The title should include topical keywords and allude to the interesting conclusions of the paper. A title that emphasizes the main conclusions, or poses a question, has more impact than one that just describes the nature of the study.
- A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.
- The Contents Category.
- The names of the authors. The author for correspondence must be clearly indicated.
- The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.
- An e-mail address and telephone and fax numbers for the corresponding author.
- The number of words in (i) the summary and (ii) the main text (including the figure and table legends and any appendices, but not the title page, summary, acknowledgements, table bodies and footnotes, or references) and the number of tables and figures.
- If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition is given in the Abbreviations section.
- A footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/**gyrA**, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.

Summary (Abstract)

The summary will be read by more people than the full paper. It must therefore be clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any abbreviations used must be defined. The summary should if possible introduce the subject in the first sentence and present the main conclusion in the last sentence: when someone is skimming a block of text, the first and last sentences receive the most attention. The recommended maximum length for the summary is 250 words.

Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason. A source (name and brief address) or reference should be given for each strain used. Authors are encouraged to deposit important strains in a recognized culture collection and to refer to the collection and strain number in the paper.

Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge individuals who have

contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

References

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith **et al.** (1996) or (Smith **et al.**, 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

Sample journal references:

Cerdà-Cuéllar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 58–61.

Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996). Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synapsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* **142**, 695–705.

Sample journal reference for more than ten authors:

Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547.

Sample reference to a whole book:

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sample reference to a book chapter or section:

Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992). Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In **The Evolution of Metabolic Function**, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

References to websites

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- an author(s) (which may be a company name or organization);
- a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- the URL (web address) of the page;
- a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes)

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

Authors who use **EndNote** or **Reference Manager** can download the style for **Microbiology** by clicking on the links below:
EndNote; Reference Manager

Please note the following style points:

- References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.
- Titles of journals should be abbreviated according to the system used by MEDLINE; no stops should be used after abbreviated words.
- References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.
- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols * † ‡ § || ¶ # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

Figures

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for inclusion as a PDF for submission and on the source files needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

Line drawings. These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

Bar diagrams. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

Sequence data. Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

Microbiology does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

Digital photographs (halftones). Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

Colour figures

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide

for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

Supplementary material

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures, movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the paper. The Editors may sometimes suggest that figures or tables that the author has included within a paper should be converted into supplementary data.

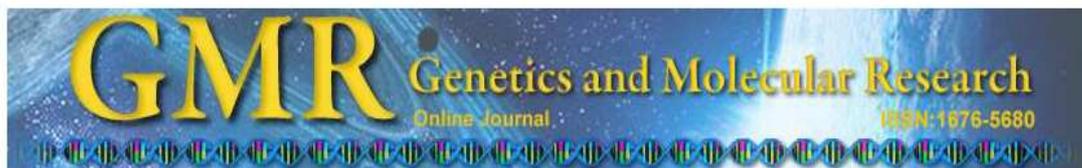
Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points. Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and be cited accordingly in the main paper. A heading and, if appropriate, a short legend or text description must be supplied for each supplementary data item.

File types and formatting for supplementary data. The contents of the supplementary file should be indicated in the 'File label' field when the file is uploaded. Most file types can be supported but authors should try to avoid files that require unusual software, because these will be of limited use to readers. Very large files should also be avoided where possible because they may be difficult to download. Editorial staff may apply stylistic editing to supplementary files, and will, where possible, convert the files to PDF format for online publication.

6 CAPÍTULO II

Artigo aceito para publicação na revista:

Genetics and Molecular Research



Ribeirão Preto, 07 de Agosto de 2012.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo "**Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis**", GMR 2207, de autoria de M.P.S.Barros, V.M.Silveira-Filho, R.H.F.B.Lins, M.B.M.Oliveira, A.M.P.Almeida e T.C.Leal-Balbino, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,


Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis

Yersinia pestis subtyping

M.P.S.Barros^{1,2}, V.M.Silveira-Filho^{1,2}, R.H.F.B.Lins¹, M.B.M.Oliveira³, A.M.P. Almeida¹ and T.C.Leal-Balbino^{1,2}

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

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

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

Corresponding author: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino.

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

ABSTRACT. We subtyped of Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This was done with 22 Brazilian *Y. pestis* strains: 17 from an outbreak and five from endemic routine surveillance. The strains were divided into two groups (I - II), eight subgroups (A - H) and 19 PFGE profiles or pulsotypes. PFGE did not separate outbreak from non-outbreak strains, as identical pulsotype patterns were found among outbreak strains and strains obtained from surveillance. However, it was able to detect intraspecific genetic diversity among Brazilian strains. This PFGE technique was able to differentiate a homogeneous group of Brazilian *Y. pestis* strains.

Key words: *Yersinia pestis*; Molecular epidemiology; Pulsed-field gel electrophoresis.

INTRODUCTION

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

Y. pestis was introduced to Brazil by the sea route during the third pandemic, in 1899, and became established among the native rodents in rural areas in several ecological complexes (WHO, 1965; Baltazard, 2004). Apart from sporadic epidemics, from 20 to 100 cases were annually reported until the mid-1980s, when all the foci tended to quiescence (WHO, 2006). During a plague outbreak in September 1986 in the Chapada da Borborema focus (Paraíba State) in the northeastern region (Figure 1), 20 *Y. pestis* strains were isolated from humans (3) and rodents (17): *Rattus rattus* (6), *Necromys lasiurus*

(6), *Oryzomys subflavus* (4) and *Holochillus sciurus* (1) (Almeida et al., 1989). These cultures are deposited in the *Yersinia* spp Collection (Fiocruz – CYP) maintained by the National Service for Reference in Plague from the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE (SRP/FIOCRUZ-PE), Recife, PE, Brazil (Rocha et al., 2009). The strains appeared to be homogenous regardless of their origin concerning their plasmid content (Leal et al., 1989; Leal et al., 2000), outer membrane protein profile (Abath et al., 1989), and RAPD and PCR – ribotyping analysis (unpublished results). Currently, studies on the molecular epidemiology of *Y. pestis* have been hampered due to the great similarity of isolates (Vogler et al., 2011). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a highly discriminatory and versatile method and has been used in bacterial epidemiological and evolutionary studies and it proved useful for molecular subtyping of many bacteria whereas other molecular methods showed low discriminatory ability (Tenover et al., 1995).

The purpose of this study was to perform a molecular subtyping by PFGE of Brazilian *Y. pestis* strains: 17 from an outbreak and five from endemic routine surveillance. The results demonstrated intraspecific genetic diversity in the samples studied previously considered homogeneous. Therefore, PFGE will allow large-scale analysis of strains and identify major genetic variation among the strains.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Two sets of *Y. pestis* strains from the Fiocruz – CYP collection (SRP/FIOCRUZ-PE), Recife, PE, Brazil): 17 from the 1986 outbreak in the Paraíba State, Brazil (Almeida et al., 1989) and five from the endemic area routine plague program surveillance from 1978-1982 (Almeida et al., 1985) (Table 1). They are maintained in peptone agar stab tubes at 4°C in a biosafety level 3 laboratory (BSL3). Outbreak strains were identified as P (plague), PB (state of origin), and sequential number. Other strains were identified as P (plague), Exu (laboratory location), and sequential number.

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

The cultures were inoculated into brain heart infusion broth (BHI, Himedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, India) and incubated at 28°C for up to seven days. Culture growth was confirmed by the plague phage test (Karimi, 1978), plated on blood agar base (BAB, Himedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, India) and incubated at 28°C for up to five days.

PFGE protocol

Genomic DNA of the *Y. pestis* strains was prepared in agarose plugs following a CDC Pulsenet protocol (www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm), with some modifications. *Y. pestis* cells grown on BAB plates for 48 h at 28°C were suspended in cell suspension buffer (CSB: 100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) and adjusted to an absorbance of 1.0 at 600 nm in a spectrophotometer (Biotech Photometer, WPA, Cambridge, UK). Pulsed-field certified agarose (2%; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used for genomic DNA plug preparation. Cell lysis within agarose plugs was carried out in lysis buffer (CLB: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% sarcosyl) and proteinase K at 54°C for 2 h under constant and vigorous shaking. Digestion was carried out at 37°C with the *Ascl* enzyme (20 U/μL) at 37°C for 6 h in the enzyme buffer supplied by the manufacturer. Restricted plugs were washed at 50°C with sterile ultrapure water (x2) and TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) (x4), 10 min each. Digested fragments were separated using CHEF-DR III, Bio-Rad system (Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields/Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 1% Seakem Gold agarose (Lonza, Rockland, ME, USA) gels and running buffer of 0.5% TBE at 14°C with a ramping time of 4.5 V/cm for 22 h.

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

PFGE pattern analysis

The BioNumerics program (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium) was used to determine the presence or absence of bands and the similarity between samples was inferred using BioNumerics program version 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium). A dendrogram based on PFGE data was constructed with the Dice coefficient, using UPGMA at 1.5% tolerance, and the PFGE protocol discriminatory ability was determined by the Simpson diversity index (discrimination index [D]) (Hunter and Gaston, 1988).

RESULTS

PFGE protocol optimization

Protocol optimization that provided consistent and reproducible results comprised the following modifications (Table 2).

PFGE protocol performance

Discriminatory ability

The PFGE protocol appeared to be highly efficient in discriminating between *Y. pestis* strains (Simpson diversity index, 0.93). *Ascl* restriction generated neat and clear bands. DNA fragments ranging from 50 to 300 kb were considered for analysis (Figure 2). The dendrogram based on PFGE divided the strains into two clusters or groups (I and II) at a 70% similarity cutoff, and eight subgroups (A-H) at an 80% similarity cutoff and allowed the distinction

of 19 PFGE profiles or pulsotypes (Figure 2). Cluster I grouped together seven samples (one human and six outbreak and non-outbreak rodent strains) subdivided into two subgroups (A and B) and six PFGE profiles or pulsotypes. Cluster II grouped together 15 isolates (one human and 14 outbreak and non-outbreak rodent strains) subdivided into six subgroups (C-H) and 13 PFGE profiles or pulsotypes. All (A-G subgroups) but subgroup H included two to four isolates (19 PFGE profiles or pulsotypes) (Figure 2).

PFGE profile stability and technique reproducibility

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

Host distribution

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

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

Spatial distribution

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

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

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

Temporal distribution

Identical pulsotypes were found in different years; outbreak strains were not separated from non-outbreak strains by their PFGE patterns: pulsotype F1 occurred in 1980 and 1986 (P. Exu 843 and P. PB 876) in different rodent hosts

and counties, and pulsotype G1 in 1980 and 1982 (P. Exu 851 and P. Exu 860) from the same host but different counties (Figure 2).

DISCUSSION

Among the several typing molecular methods, PFGE macrorestriction analysis has been shown to be highly valuable for grouping and differentiating many pathogenic bacteria. Although PFGE sensitivity and discriminatory ability depend on the restriction enzyme and organism studied, its high performance has become valuable for typing many bacteria and discriminating *Y. pestis* strains (Guiyoule et al., 1994; Huang et al., 2002; Revazishvili et al., 2008; Zhang et al., 2009).

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

Analysis of multiple-locus variable-number tandem repeats (MLVA) has demonstrated intraspecific genetic diversity among Brazilian plague strains. This analysis establishes a relative correlation among genetic groups, which is related to the temporal and geographic origin of the isolates (Oliveira et al., in press).

PFGE also revealed genetic heterogeneity among the 22 strains analyzed. Most strains from the same spatial, temporal and host origin displayed different pulsotypes. Surprisingly, strains from the same rodent species during the outbreak displayed different profiles, for the same profile would be expected in strains closely related epidemiologically. These different *Y. pestis* populations may reflect microevolution of the invading strain due to environmental pressure experienced while spreading inland from the coast. In fact they are all descendant from the strain disseminated worldwide during the third pandemic, biovar Orientalis (glycerol negative and nitrate positive) (Perry and Fetherston, 1997).

On the other hand, identical patterns for strains from different localities and time periods confirm their common origin, in line with a single introduction of *Y. pestis* in Brazil (WHO, 1965; Baltazard, 2004). PFGE pattern alterations associated with serial subculturing of *Y. pestis* isolates have been reported (Lucier and Brubaker, 1992; Guiyoule et al., 1994). Leal-Balbino et al. (2004, 2006) and Leal et al. (2000) observed spontaneous alterations in the genome (plasmid and chromosomal) of Brazilian *Y. pestis* as a result of prolonged storage and handling in the laboratory. The stability of the PFGE profiles was investigated by the analysis of serial subcultures of three strains. Each strain exhibited a unique PFGE profile and derived cultures revealed the same parental profile.

The generally accepted explanation for hypervariability in PFGE types of *Y. pestis* strains is intragenomic recombination between IS elements, usually leading to inversion of genome segments rather than deletion, although deletion

can obviously occur (Lucier and Brubaker, 1992). Pigmentation segment deletion and plasmid deletions in Brazilian strains have been reported (Almeida et al., 1994; Leal et al., 2000; Leal-Balbino et al., 2006). Moreover, Guiyoule et al. (1994) found a pigmentation deletion in vitro, which gave a new PFGE type, although they did not suggest that all new PFGE types were due to this deletion.

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

In conclusion, in the present work, we demonstrated the usefulness of PFGE for discriminating Brazilian *Y. pestis* isolates. The results obtained by the analysis of two sets of strains (17 from an outbreak and five during the endemic period) revealed intraspecific genetic diversity in the samples studied, which will provide insight into the homogeneity of the group of Brazilian *Y. pestis* strains.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by the Serviço Nacional de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Process No. 482694/2009-2. We thank Henri Berghs Inc. of Fairport, representing Applied Maths, for technical assistance with Bionumerics programs.

REFERENCES

- Abath FGC, Almeida AMP and Ferreira LC (1989). Electrophoretic Characterization Of The Outer Membrane Proteins Of *Yersinia pestis* Isolated In North-East Brazil. *Epidemiol. Infect* 103: 595-602.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG and Almeida CR (1985). Isolation of *Yersinia pestis* in plague foci of Northeast Brazil from 1966 to 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 27: 207-218.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, et al. (1989). Bacteriological and serological studies of a plague outbreak in the Paraíba, State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84: 249-256.
- Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane, ACM, Tavares C, et al. (2009). Prevalence of antibodies against *Yersinia pestis* in domestic carnivores, in plague foci in the State of Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med Trop* 42: 711-715.

- Baltazard M (2004). 4^e rapport (mai 1970) Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 97 (supplément): 93-117.
- Dice LR (1945). Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 379-393.
- Duplantier JM, Duchemin JB, Chanteau S and Carniel E (2005). From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Vet. Res* 36: 437-453.
- Gage KL and Kosoy MY (2005). Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol* 50: 505-528.
- Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, Grimont PAD, et al. (1994). Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol* 32: 634-641.
- Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM and Lindler LE (2002). Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J. Clin. Microbiol* 40: 1164-1173.
- Hunter PR and Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol* 26: 2465-2466.
- Karimi Y (1978). Rapid laboratory diagnosis of plague. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 71: 45-48.
- Leal NC, Almeida AMP and Ferreira LCS (1989). Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraíba State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 31: 295-300.
- Leal NC and Almeida AMP (1999). Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41: 339-342.
- Leal NC, Sobreira M, Leal TCA and Almeida AMP (2000). Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. *Braz. J. Microbiol* 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CGV and Almeida AMP (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 727-732.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Nascimento MGM, Oliveira MBM, et al. (2006). The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genet. Mol. Biol* 99: 727 - 732.
- Lucier TS and Brubaker RR (1992). Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed field electrophoresis. *J. Bacteriol* 174: 2078-2086.
- Oliveira MBM, MPS Barros, VM Silveira-Filho, MR Araújo-Nepomuceno, et al. In press 2012. The Genetic Diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet. Mol. Res*, in press 2012.
- Perry RD and Fetherston JD (1997). *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev* 10: 35-66.
- Revazishvili T, Rajanna C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, et al. (2008). Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect* 14: 429-436.

- Rocha SS, Almeida AMP, Leal NC, Cordeiro MT, et al. (2009). Biological collections from Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation: analysis of a workshop. *Rev. Pat. Trop* 38: 299-309.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, et al. (2008). Plague: past, present and future. *PLoS Medicine* 5: 9-13.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* 9: 2233-2239.
- Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, et al. (2011). Phylogeography and Molecular Epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis* 5: e1319.
- WHO (1965). Plague in the Americas. *World Health Organization Scientific Publications* 115: 44-68.
- WHO (2006). International meeting on prevention and controlling plague: the old calamity still has a future. *World Health Organization Scientific Publications* 80: 278-284.
- WHO (2010). Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004-2009. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 40-45.
- Zhang Z, Hai R, Song Z, Xia L, et al. (2009). Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan Province of China. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81: 714-717.

FIGURE CAPTIONS

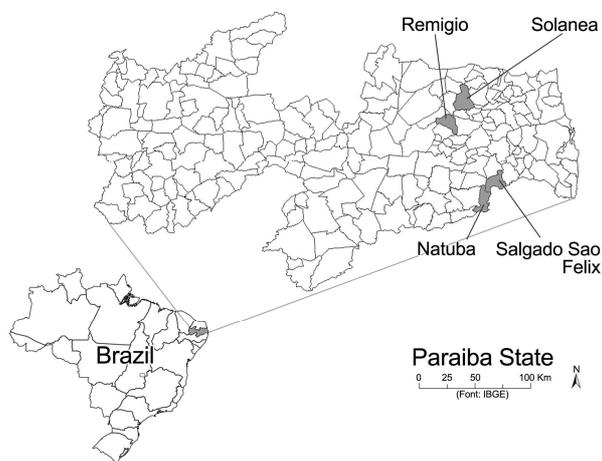


Figure 1. Map of Brazil and Paraiba State showing the Counties from the *Yersinia pestis* strains originated.

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

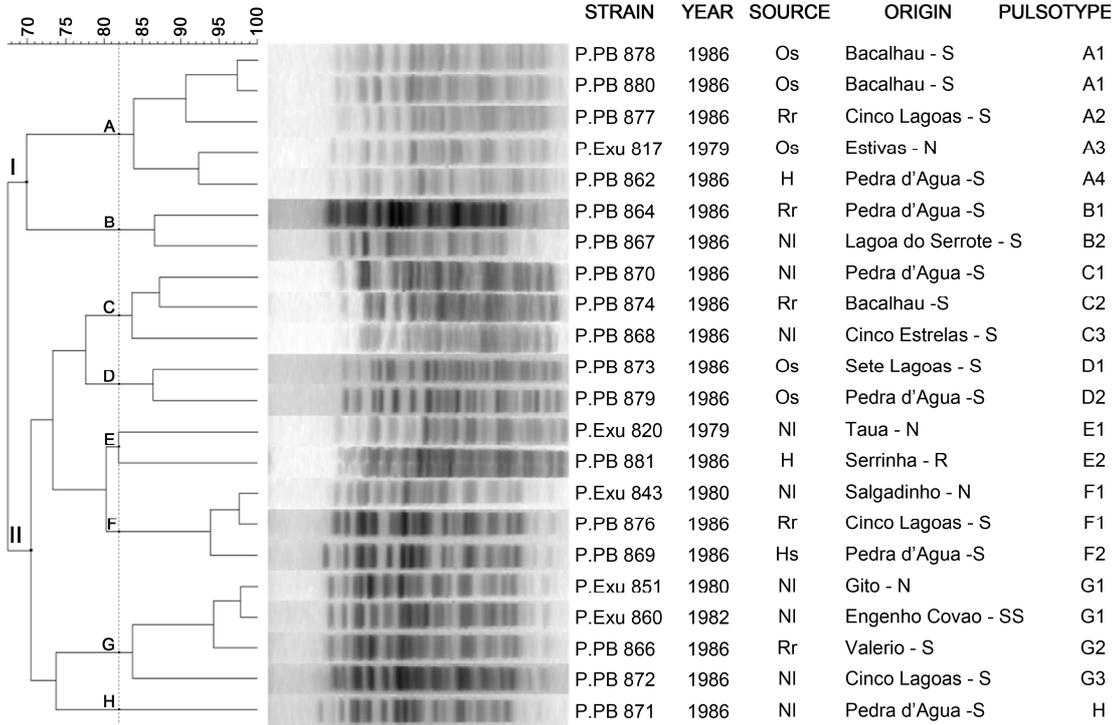


Figure 2. Dendrogram generated by BioNumerics software from PFGE cuts by *Ascl* on 22 Brazilian *Yersinia pestis* strains. N: Natuba; R: Remigio; S: Solanea; SS: Salgado de Sao Felix municipalities. Os: *Oryzomys subflavus*; NI: *Necromys lasiurus*; Rr: *Rattus rattus* rodent species; Hs: *Holochilus sciureus*; H: Humans.

TABLE 1. Host source and spatial and temporal distribution of the *Yersinia pestis* strains studied.

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

^a*Rattus rattus*; ^b*Necromys lasiurus*; ^c*Oryzomys subflavus*; ^d*Holochilus sciureus*

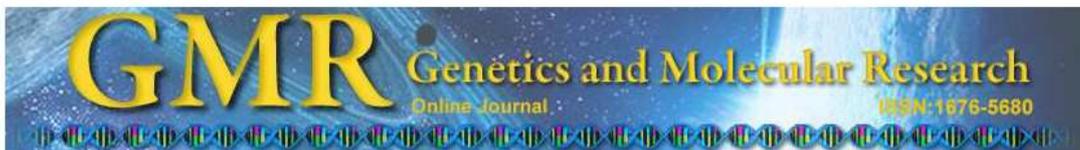
TABLE 2. Comparison between the standard and optimized protocols for PFGE typing of *Yersinia pestis*.

Procedure	Standard protocol (CDC)	Optimized protocol
Bacterial concentration	610 nm wavelength, absorbance of 1.35	610 nm wavelength, absorbance of 1.0
Agarose plugs preparation	1% Agarose SeaKem Gold	2% Pulsed-Field Certified Agarose Bio-Rad
Restriction digestion	Ascl: 40 U; 4h	Ascl: 20 U; 6h
Running conditions	6 V/cm	4.5 V/cm

7 CAPÍTULO III

Artigo aceito para publicação na revista:

Genetics and Molecular Research



Ribeirão Preto, 11 de abril de 2012.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo "*Genetic diversity of Yersinia pestis in Brazil*", GMR 1815, de autoria de **M. B. M. Oliveira, M. P. S. Barros, V. M. Silveira-Filho, M. R. Araújo-Nepomuceno, V. Q. Balbino, N. C. Leal, A. M. P. Almeida and T. C. Leal-Balbino**, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,083, segundo JCR - junho 2011.

Atenciosamente,

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

The Genetic Diversity of *Yersinia pestis* in Brazil

Brazilian *Y. pestis* diversity

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

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

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

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

Corresponding author: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino.

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

ABSTRACT. Due to great genetic similarity molecular subtyping of *Yersinia pestis* strains has been difficult. Analysis of multiple-locus variable-number tandem repeats (VNTR), also known as MLVA, revealed a valuable tool to discriminate among strains. To uncover any genetic difference, strains obtained from two different ecological complexes in Brazil during two different epidemiological events, an epizootic in Sitio Alagoinha in 1967 and an outbreak in Planalto da Borborema in 1986 were subtyped through MLVA using 12 VNTR loci. Three clusters (A, B and C) were observed. Out of the 20 strains from the epizootic, 18 fit into cluster A. Cluster A was divided into two subgroups: A₁ (15 strains) and A₂ (3 strains). Out of the 17 strains from the outbreak, 15 fit into cluster B. Cluster B was divided into three subgroups: B₁ (4 strains), B₂ (4 strains) and B₃ (7 strains). Cluster C is a singleton with one epizootic strain. The external standards, *Y. pestis* CO92 and *Y. pseudotuberculosis* IP32953, formed two clusters of singletons. The stability of 12 VNTR loci of three unrelated cultures included in this study was assessed. The 12 VNTR loci were stable through multiple serial subcultures in the laboratory. MLVA revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic and demonstrated intraspecific genetic diversity among Brazilian plague strains. This analysis establishes a relative correlation among genetic groups, which is related to the temporal and geographic origin of the isolates.

Key words: Plague, molecular epidemiology, MLVA.

INTRODUCTION

The plague, caused by infection with *Yersinia pestis*, was introduced into Brazil by sea through infected rats and fleas conveyed on steam ships during the last pandemic, which originated in China in 1855. Records of the early history of the plague in Brazil are discontinuous and sparse, which makes detailed tracking difficult to impossible. Systematic information became available only after the 1930s (Pollitzer, 1954; Baltazard, 1968). Nevertheless,

there is a general consensus that the first human case was registered in October 1899 in Santos, in São Paulo state. From then on, other coastal cities became successively infected. Government control measures were promptly undertaken, and the infection was eliminated from the coast; however, these measures did not stop the spread of the plague to inland cities, towns and villages. The plague reached rural areas, afflicting small districts, farms and ranches. The plague then established many natural foci among the wild rodents in several ecological complexes, from the State of Ceara to the north of Minas Gerais (collectively named the Northeast focus) and in the Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro (WHO, 1965; Baltazard, 1968).

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

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

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

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains studied

The study involved 37 *Y. pestis* strains that were kindly provided by the Fiocruz-CYP culture collection, which is maintained by the SRP/CPqAM-FIOCRUZ/PE. Twenty strains were isolated from rodents and fleas during an epizootic in August 1967. This epizootic occurred in Sitio Alagoinha, a locality

situated in Chapada do Araripe, Pernambuco state (Almeida et al., 1985). Seventeen strains were isolated from an outbreak in 1986, which involved several municipalities in Planalto da Borborema, Paraíba state (Almeida et al., 1989). Three unrelated strains (P. CE 882, P. Exu 340 and P. Peru 375) and 11 derived cultures obtained through multiple serial subcultures of the parental strains (Leal-Balbino et al., 2004) were included to assess *in vitro* VNTR stability. Figure 1 shows the localization of the Brazilian plague foci and origin of the strains.

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

Culture conditions

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

VNTR primers

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

DNA extraction and PCR amplification

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

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

Cluster analysis

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

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

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

Discriminatory analysis

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

Sequencing

For sequencing, the amplicons were purified with the Purelink PCR purification kit (Invitrogen, Brazil), following the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed with the same primers used for PCR. An ABI 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) and the BigDye Kit (Applied Biosystems) were used for sequencing. The Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) (Altschul et al., 1997) was used to confirm the identity of the sequenced amplicons by comparing them against the NCBI databank of non-redundant nucleotide sequences. Seq Tools 8.3.022 (Rasmussen, 2002) and Bio Edit v. 7.0.5.2 (Hall, 1999) were used to edit the generated sequences.

The sequences were submitted to and published in the GenBank database under the following accession numbers: 1AB (GI:89112565); ms04 (GI:238867221); ms05 (GI:238867222); ms06 (GI:89112563); ms07 (GI:238867223); ms09 (GI:238867224); ms20 (GI:238867225); ms30 (GI:238867226); ms45 (GI:238867227); ms46 (GI:238867228); ms54 (GI:238867229); and ms62 (GI:238867230). The copy number variation of the

VNTR loci was determined with the Tandem Repeats Finder tool (Benson, 1999) using the basic alignment parameters described on the homepage of the software (accessible at <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

RESULTS

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

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

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

Using a cut-off value of 2.5 differences, the 37 epizootic and outbreak strains were separated into three distinct clusters (A, B and C). The external standards, *Y. pestis* CO92 and *Y. pseudotuberculosis* IP32953, formed two distinct singletons (Figure 4). Cluster A was divided into two subgroups: A₁ (15 strains) and A₂ (5 strains). Cluster B was divided into three subgroups: B₁ (4 strains), B₂ (5 strains) and B₃ (7 strains). Cluster C is a singleton (Figure 4).

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

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

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

DISCUSSION

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

In the present work, a phylogenetic analysis based on 12 VNTRs was performed on *Y. pestis* strains from two different epidemiological events in two Brazilian northeastern plague areas: an epizootic in Chapada do Araripe, Pernambuco state (Almeida et al., 1985) and an outbreak in Planalto da Borborema, Paraíba state (Almeida et al., 1989).

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

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

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

In Paraíba state, plague was first registered in 1912. In September 1986, after a quiescent period of 10 years, an outbreak emerged. This outbreak spread quickly throughout 41 municipalities and affected humans and several species of rodents from many localities on the Planalto da Borborema (Almeida et al., 1989). MLVA distinguished three subgroups (B₁, B₂ and B₃) among the analyzed outbreak isolates. Thus, it appears that distinct *Y. pestis* populations (the multiple “epizootic paths”) circulated in the area during the outbreak. According to Baltazard (2004), when the rodent population density is high, each “epizootic path” extends and crosses and crisscrosses the other “paths”. This

pattern continues until the rodent population climaxes. The epizootic can then spread over vast areas, reaching all species, and then human cases arise. Most of the outbreak strains (41.2%) clustered in subgroup B₃ and one human strain (P. PB 862) clustered with two *N. lasiurus* strains isolated from the same locality.

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

In Brazil, all the plague foci have been mostly dormant since the mid-1980s. The occurrence of new cases has been rare, and the last cases were in 1997 and 2005 in Ceará. However, serological surveys continuously detect plague antibodies on sentinel animals in plague areas (Leal and Almeida, 1999; Aragão et al., 2009), suggesting that these plague foci remain active and may reappear. Knowledge of the characteristics of local strains is essential to identifying the origin of new strains. For example, new strains may be due to natural foci emergence, reemergence, other countries or bioterrorism (Gage and Kosoy, 2005; Duplantier et al., 2005; WHO, 2006, 2010; Stenseth et al., 2008).

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

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

In conclusion, MLVA based on 12 VNTRs revealed that *Y. pestis* populations in Brazil are not monomorphic and demonstrated intraspecific genetic diversity among Brazilian plague strains. This work establishes a

relative correlation for the first time among genetic groups based on the temporal and geographic origin of the Brazilian isolates. The knowledge of local strains characteristics will be of great assistance to elucidate the origin of new strains, if by natural foci emergence, reemergence, coming from other countries or bioterrorism action.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, et al. (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 17837-17842.
- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, et al. (2000). Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG and Almeida CR (1985). Isolation of *Yersinia pestis* in plague foci of Northeast Brazil from 1966 to 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 27: 207-218.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, et al. (1989). Bacteriological and serological studies of a plague outbreak in the Paraíba, State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 84: 249-256.
- Altschul SF, Maden TL, Schaffer AA, Zhang J, et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane ACM, Tavares C, et al. (2009). Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos, do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42: 711-715.
- Baltazard M (1968). Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Rev. Bras. Mal. D. Trop.* 20: 335-366.
- Baltazard M (2004). 4^o rapport (mai 1970) – Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 97 (supplément): 93-117.
- Benson G (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 5: 573-580.
- Duplantier J, Duchemin J, Chanteau S and Carniel E (2005). From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Vet. Res.* 36: 437-453.
- Gage KL and Kosoy MY (2005). Natural history of plague: Perspectives from More than a Century of Research. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 505-528.
- Giles J, Peterson AT and Almeida A (2011). Ecology and Geography of Plague Transmission Areas in Northeastern Brazil. *Plos Neglect. Trop. D.* 5: e925.

- Girard JM, Wagner DM, Vogler AJ, Keys C, et al. (2004). Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional and global scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8408-8413.
- Hall TA (1999). Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hunter PR and Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Karimi Y (1978). Rapid laboratory diagnosis of plague. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 71: 45-48.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, et al. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182: 2928-2936.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, et al. (2001). Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3179-3185.
- Leal NC and Almeida AMP (1999). Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41: 339-342.
- Leal NC, Sobreira M, Leal TCA and Almeida AMP (2000). Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis*. *Braz. J. Microbiol.* 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CV and Almeida AM (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 727-732.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Nascimento MGM, Oliveira MBM, et al. (2006). The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genet. Mol. Biol.* 29: 126-131.
- Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, et al. (2001). A tandem repeats database of bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 1: 2.
- Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, et al. (2009). Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *Plos One* 22: e6000.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, et al. (2005). Identifying sources of human exposure to plague. *J. Clin. Microbiol.* 43: 650-656.
- Pollitzer R (1954). History and present distribution of plague in: plague. *Monogr. Ser. World Health Organ.* 22: 11-45.
- Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, et al. (2004). Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 8: 4-22.
- Rasmussen SW (2002). SEQtools, a software package for analysis of nucleotide and protein sequences. <http://www.seqtools.dk>
- Revazishvili T, Rajanna C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, et al. (2008). Characterization of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 429-436.

- Rocha SS, Almeida AMP, Leal NC, Cordeiro MT, et al. (2009). Biological collections from Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation: analysis of a workshop. *Rev. Pat. Trop.* 38: 299-309.
- Souza G, Abath F, Leal N, Farias A, et al. (2007). Development and evaluation of a Single Tube Nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. In Perry RD, Fetherston JD. *The Genus Yersinia: From Genomics to Function*, Springer, New York: 351-359.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, et al. (2008). Plague: Past, Present and Future. *Plos Med.* 5: e3.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, et al. (2011). Phylogeography and Molecular Epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Plos Negl. Trop. Dis.* 5: e1319.
- WHO (1965). Plague in the Americas. *Scient. Public. World Health Organ.* 115: 44-68.
- WHO (2006). International meeting on prevention and controlling plague: the old calamity still has a future. *Scient. Public. World Health Organ.* 80: 278-284.
- WHO (2010). Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004-2009. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 85: 40-45.

FIGURE CAPTIONS



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

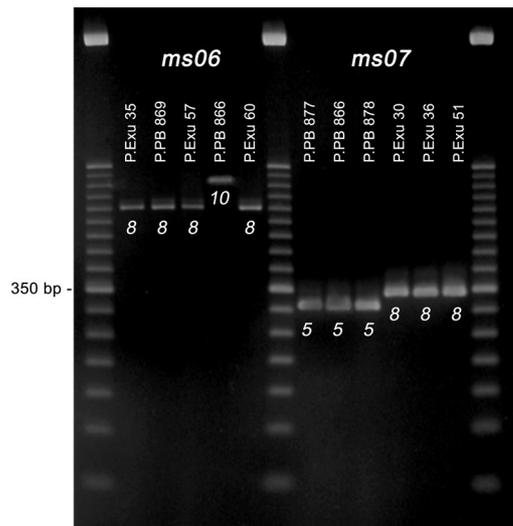


Figure 2. Analysis of PCR products by 3.0% agarose gel electrophoresis to determine repeat size polymorphisms at the ms06 and ms07 loci. The number of repeats is indicated under each amplicon.

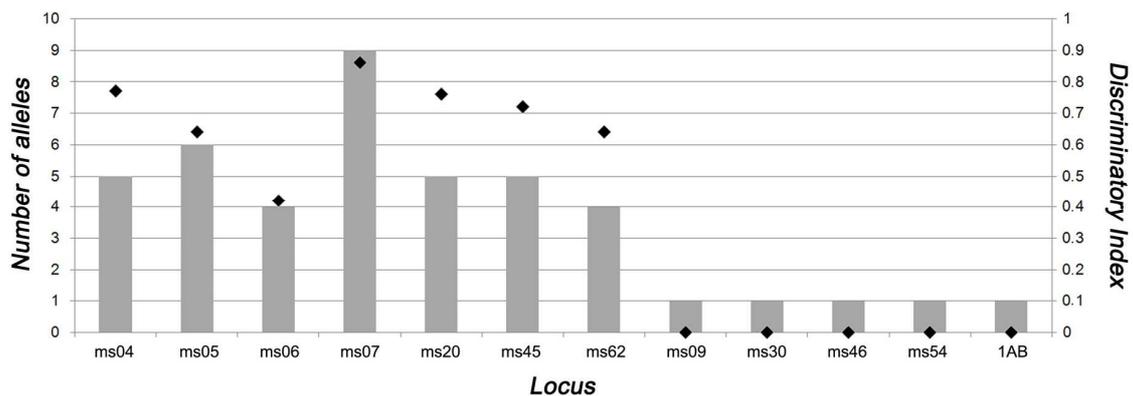


Figure 3. The distribution of the number of alleles (bars) and the discriminatory index (markers) found among the 12 VNTRs.

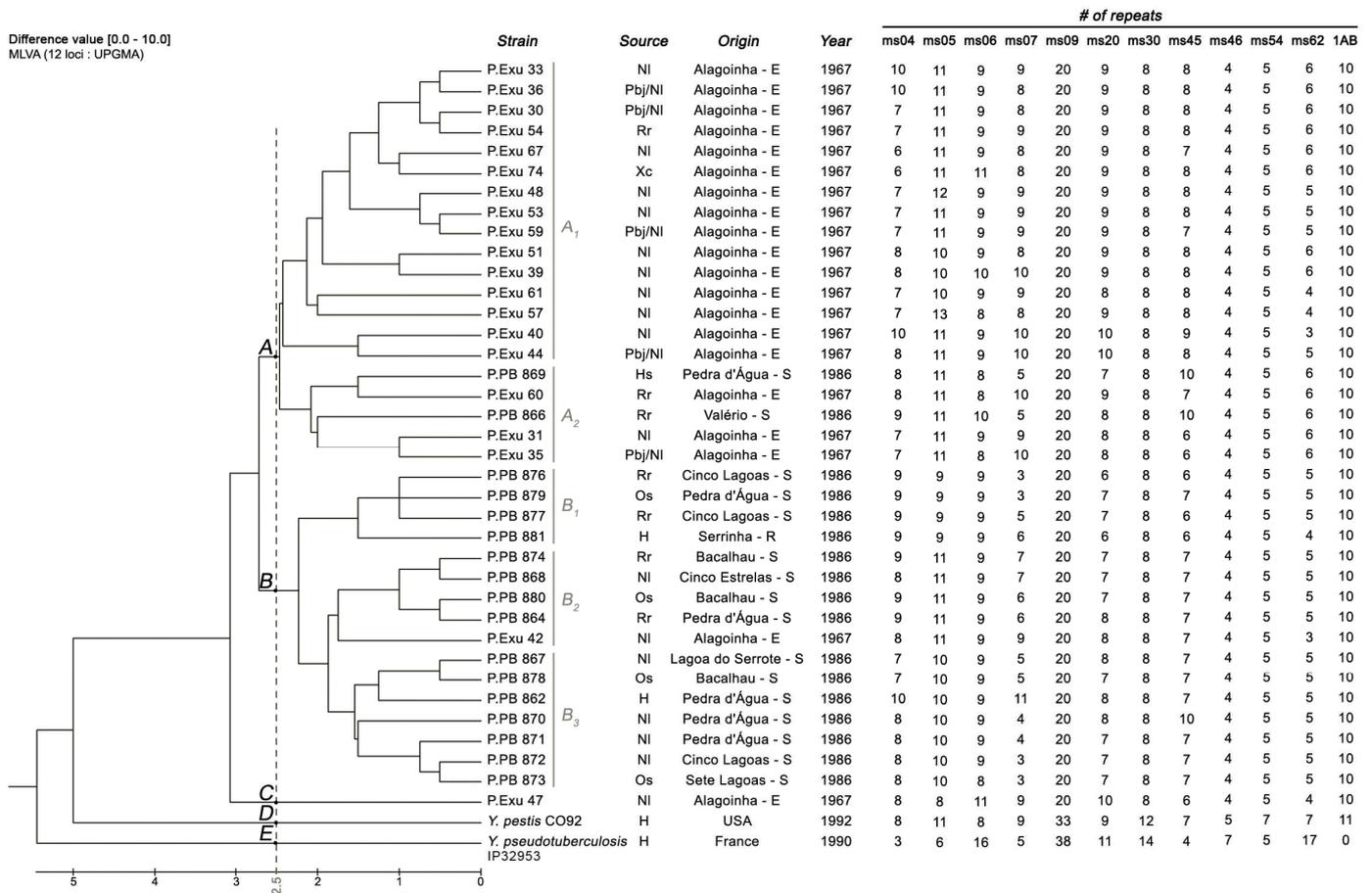


Figure 4. UPGMA dendrogram showing clustering and correlation of the *Yersinia pestis* strains studied with their origin and distribution by groups. Abbreviations: H: human; Hs: *Holochilus sciureus*; NI: *Necromys lasiurus*; Os: *Oryzomys subflavus*; Rr: *Rattus rattus*; Xc: *Xenopsylla cheopis*; Pbj/NI: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

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

Locus*	Alias	Primer sequence	Repeat Unit	Reference for primer
ms04	M58	(F) 5'-GCG ATA ACC CAC ATT ATC ACA ATA ACC AAC AC-3' (R) 5'-GCT GAT GGA ACC GGT ATG CTG AAT TTG C-3'	17 bp	Klevytska et al. (2001)
ms05	M59	(F) 5'-GCT TAG CCG CCA GAA AAG GTG AGT TGG C-3' (R) 5'-GAT AAT GGC GGT AGC CGG AAT CTG ATA ATC ATC-3'	17 bp	Klevytska et al. (2001)
ms06	-	(F) 5'-AAT TTT GCT CCC CAA ATA GCA T-3' (R) 5'-TTT TCC CCA TTA GCG AAA TAA GTA-3'	60 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms07	M37	(F) 5'-GCC ACA GGA AGA GGA CAT TTC AGA GAA AAC-3' (R) 5'-GTT GCT AAA ACG ATA CCG CTA CGA TCA GC-3'	10 bp	Klevytska et al. (2001)
ms09	-	(F) 5'-CGT TAC CCT TGT TGC CAA TAG T-3' (R) 5'-ACG CAG AAC ATG CTT ACC TTT TAT-3'	18 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms20	M51	(F) 5'-GCA ACC CGC TGA AGT TGT AAA AAC CGA C-3' (R) 5'-GCG TTG ATC TTC GCG GCC TTC AC-3'	15 bp	Klevytska et al. (2001)
ms30	-	(F) 5'-CAA TAA TAC CAT CGT GCG TGA TAC-3' (R) 5'-TAT TAA TGG TGG TGT TAG TCG CTG T-3'	54 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms45	M42	(F) 5'-GCC GGT AGA GGC GTT GTC TTT GGT TTT TTC-3' (R) 5'-GTT TTG GGG TTC AGT GCA CGC TTG TGA C-3'	12 bp	Klevytska et al. (2001)
ms46	-	(F) 5'-CAG GTT TTA CGT TAT TTT CTG AAG G-3' (R) 5'-CAG CAT GAA GTA TGA CGG GTA TAT TA-3'	7 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms54	-	(F) 5'-GTC CAC CAT TTT CAT ACT GTC ACT T-3' (R) 5'-GCT CTT TGT TCG ATT TTA TTG AAT G-3'	22 bp	Le Flèche et al. (2001)
ms62	M34	(F) 5'-GAA TCG CGG GTT GAC GCT GTT GAG C-3' (R) 5'-GCT GAA CAG CCC CAT AAA ACC GGA GC-3'	9 bp	Klevytska et al. (2001)
1AB	-	(F) 5'-GGT TAG GTA GGG TGT TGA AG-3' (R) 5'-AAA GAG GCT AAG TGG CAA-3'	4 bp	Adair et al. (2000)

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

8 CONCLUSÕES

- O estudo com os locos CRISPR aplicados em cepas brasileiras de *Y. pestis* contribuiu para genotipagem e compreensão da microevolução dos isolados de diferentes focos, além de permitir estabelecer uma correlação genética e geográfica. No entanto, ainda se faz necessário dar continuidade ao estudo dos aspectos funcionais e evolutivos do CRISPR nestes isolados;
- As cepas de *Y. pseudotuberculosis* apresentaram grande diversidade estrutural dos locos CRISPR, impossibilitando gerar perfis genotípicos. Alguns aspectos foram semelhantes entre as duas espécies de *Yersinia*, reforçando a proximidade genética entre elas;
- Os biovares de *Y. pestis*, analisados pelos locos CRISPR, foram agrupados adequadamente, apresentando clusteres específicos. Os arranjos de espaçadores permitiram o estabelecimento de uma assinatura CRISPR entre os biovares *Orientalis* e *Medievalis*;
- O estudo das cepas brasileiras de *Y. pestis* pelo PFGE demonstrou diversidade genética entre elas, mas não foi capaz de separar as cepas pertencentes aos dois eventos epidemiológicos. Entretanto, este método permanece como uma ferramenta alternativa na caracterização de novos isolados de *Y. pestis*;
- A análise pelo MLVA revelou que a população de cepas brasileiras de *Y. pestis* estudadas não foi monomórfica e estabeleceu uma correlação genética, geográfica e temporal;
- Entre os três métodos moleculares aplicados no estudo das cepas brasileiras de *Y. pestis*, o MLVA e o CRISPR revelaram melhor relação entre os dados epidemiológicos e moleculares. O PFGE poderá ter sua contribuição na caracterização de novos isolados de *Y. pestis*;
- Os estudos com os marcadores moleculares permitiram ratificar a entrada de apenas um clone de *Y. pestis* no Brasil, enfatizando algumas adaptações genéticas importantes para a sua microevolução.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A and Carniel E (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 14043-14048. Erratum in: Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:8192.
- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, Vogler AJ, Wagner DM, Allender CJ, Easterday WR, Chenal-Francisque V and Keim, P. (2004) Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 101: 17837-17842.
- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM and Keim P (2000). Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J Clin Microbiol 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG and Almeida CR (1985). Isolation of *Yersinia pestis* in plague foci of Northeast Brazil from 1966 to 1982. Rev Inst Med Trop S Paulo 27: 207-218.
- Almeida AMP, Tavares C and Leal-Balbino TC (2005) Peste. In: COURA, J.R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2nd edition. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap 126, pp 1509-1522.
- Almeida AM, de Souza GT, Santos S, Silva SC, Petribú Mde M, Haver Pde O, Aragão AI and Tavares C (2007). Contribution towards plague diagnosis. Rev Soc Bras Med Trop 40: 53-55.
- Almeida AM, de Souza GT, Santos S, Silva SC, Petribú Mde M, Haver Pde O, Aragão AI and Tavares C (2007). Contribution towards plague diagnosis. Rev Soc Bras Med Trop 40: 53-55.
- Almeida AMP and Tavares C (2010). Peste. In: Veronesi; Foccacia. (Org.). Tratado de infectologia. 4nd edition. Atheneu, São Paulo, 1187-1200.
- Anisimov AP, Lindler LE and Pier GB (2004). Intraespecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev 17: 434-464.
- Anisimov AP, Lindler LE and Pier GB (2004). Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microb Rev 17: 434-464.
- Aragão AI, Pontes RJ, Seoane AC, Nascimento OJ, Tavares C and Almeida AM (2007). Secular plague trend in Ceará State, Brazil. Cad Saude Publica 23: 715-24.

- Aragão AI, Pinheiro KM, Seoane AC, Tavares C and Almeida AM (2009). Prevalence of antibodies against *Yersinia pestis* in domestic carnivores, in plague foci in the State of Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:711-715.
- Baker S, Hanage WP and Holt KE (2010). Navigating the future of bacterial molecular epidemiology. *Curr Opin Microbiol* 13: 640-645.
- Baquar N, Threlfall EJ, Rowe B and Stanley J (1994). Phage type 193 of *Salmonella typhimurium* contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. *FEMS Microbiol Lett* 115: 291-295.
- Barrangou R and Horvath P (2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 143-162.
- Barros MPS, Silveira-Filho VM, Lins RHFB, Oliveira MBM, Almeida AMP and Leal-Balbino TC (*in press* 2012). Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genet Mol Res in press* 2012.
- Bhaya D, Davison M and Barrangou R (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45: 273-297.
- Bik EM, Gouw RD and Mooi FR (1996). DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J Clin Microbiol* 34: 1453-1461.
- Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglechner N, Coombes BK, McPhee JB, DeWitte SN, Meyer M, Schmedes S et al. (2011). A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* 478: 506-510.
- Botes J, Williamson G, Sinickas V and Gürtler V (2003). Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Riboprinting and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. *J Microbiol Methods* 55(1): 231-240.
- Brasil. Manual de vigilância e controle da peste (2008). Ministério da saúde/Secretaria de vigilância em saúde. 1nd editon. Brasília.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV and van der Oost J (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960-964.

- Brubaker RR (1983). The Vwa+ virulence factor of *Yersinia*: the molecular basis of the attendant nutritional requirement for Ca⁺⁺. *Rev Infect Dis* 5: 748-758.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V et al. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*: 23.
- Buchrieser C, Prentice M and Carniel E (1998). The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J Bact* 9: 2321-2329.
- Butler T (2009). Plague into the 21st century. *Clin Infect Dis* 49: 736-742.
- Campbell J, Lowe J, Walz S and Ezzell J (1993). Rapid and specific identification of *Yersinia pestis* by using a nested polymerase chain reaction procedure. *J Clin Microbiol* 31: 758-759.
- Carniel E (2008). Plague today. *Med Hist Suppl* 27: 115-122.
- Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, Georgescu AM, Vergez LM, Land ML, Motin VL et al. (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13826-13831.
- Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, Worsham P, Chu MC and Andersen GL (2006). Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol* 188: 4453-4463.
- Chen TH and Elberg SS (1977). Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type 1. *Infect Immun*. 15: 972-977.
- Connor DH and Chandler FW (1997). *Pathology of Infectious Diseases*, Appleton & Lange, Stamford.
- Cornelis GR (2000). Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8778-8783.
- Costa F, Manaia CM, Figueiral MH and Pinto E (2008). Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. *Lett Appl Microbiol* 46: 445-449.

- Cui Y, Li Y, Gorgé O, Platonov ME, Yan Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Balakhonov SV, Wang X et al (2008). PLoS One 3: e2652.
- Davis MA, Hancock DD, Besser TE and Call DR (2003). Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol 41: 1843-1849.
- de Benito I, Cano ME, Agüero J and García Lobo JM (2004). A polymorphic tandem repeat potentially useful for typing in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. Microbiology. 2004 Jan;150(Pt 1):199-204.
- den Dunnen JT and van Ommen GJB (1992). Methods for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Appl Biochem Biotechnol 38: 161-177.
- Deng W, Burland V, Plunkett G 3rd, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, Perna NT, Rose DJ, Mau B, Zhou S et al. (2002). Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J Bacteriol 184: 4601-4611.
- Dentovskaya SV, Anisimov AP et al. (2009). Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. PLoS One 4: e6000.
- Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, Fayolle C, Prévost MC, Médigue C, Hinnebusch BJ and Carniel E (2007). A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. Mol Microbiol 63: 1145-1157.
- Devignat R (1951). Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. Bul l'organ M San 4: 247- 263.
- Du Y, Rosqvist R and Forsberg A (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. Infect Immun 70: 1453-1460.
- Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP, Riley DR, Sebastian Y, Mou S, Achtman M, Lindler LE and Ravel J (2010). Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J Bacteriol 192: 1685-1699.
- Filippov AA, Oleńnikov PN, Drozdov AV and Protsenko OA (1990). The role of IS-elements of *Yersinia pestis* (Lehmann, Neumann) in the emergence of calcium-independent mutations. Genetika 26: 1740-1748.
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ et al. (2003). Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J Clin Microbiol 41: 1963-1970.

- Fundação Nacional de Saúde (2002). (Brasil) Peste In: _____. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF, 641-652.
- Gage KL, Kosoy MY 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol* 50: 505-528.
- Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, Rasoamanana B, Chanteau S, Carniel E and Courvalin P (1997). Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med* 337: 677-680.
- Garcia E, Worsham P, Bearden S, Malfatti S, Lang D, Larimer F, Lindler L and Chain P (2007). Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv Exp Med Biol* 603:17-22.
- Grammenou P, Spiliopoulou I, Sazakli E and Papapetropoulou M (2006). PFGE analysis of enterococci isolates from recreational and drinking water in Greece. *J Water Health* 4: 263-269.
- Grimont F and Grimont PAD (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microb* 137: 165-175.
- Grissa I, Vergnaud G and Pourcel C (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W52-7.
- Grissa I, Bouchon P, Pourcel C and Vergnaud G (2008). On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90: 660-668.
- Guiyoule A, Gerbaud G, Buchrieser C, Galimand M, Rahalison L, Chanteau S, Courvalin P and Carniel E (2001). Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis* 7: 43-48.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF and Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1: e60.
- Hervé Bercovier, Mollaret HH, Alonso JM, Brault J, Fanning RG, Steigerwalt AG and Brenner DJ (1980). Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr Microbiol* 4: 225-229.

- Hinnebusch J and Schwan TG (1993). New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. J Clin Microbiol 31: 1511-1514.
- Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG and Forsberg A (2002). Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. Science 296: 733-735.
- Hinnebusch BJ (2003). Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flea vector of plague. Adv Exp Med Biol 529: 55-62.
- Hinnebusch BJ (2005). The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. Curr Issues Mol Biol 7: 197-212.
- Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, and Barrangou R (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol 190, 1401-1412.
- Horvath P, Coûté-Monvoisin AC, Romero DA, Boyaval P, Fremaux C and Barrangou R (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. Int J Food Microbiol 131: 62-70.
- Horvath P and Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. Science 327: 167-170.
- Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM and Lindler LE (2002). Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. J Clin Microbiol 40: 1164-1173.
- Hudson BW, Quan TJ, Sites UR and Marshall JD (1973). An electrophoretic and bacteriologic study of *Yersinia pestis* isolates from Central Java, Asia and Western hemisphere. Am J Trop Med Hyg 22: 642-653.
- Hudson BW and Quan TJ (1975). Electrophoretic studies of the *Yersinia*ae. Am J Trop Med Hyg 24: 968-973.
- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF et al. (2000). Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. JAMA 283: 2281-2290.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M and Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J Bacteriol 169: 5429-5433.

- Jansen R, Embden JD, Gaastra W and Schouls LM (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565-1575.
- Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- Karginov FV and Hannon GJ (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* 37: 7-19.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J and Keim P (2001). Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol* 39: 3179-3185.
- Koirala J (2006). Plague: disease, management, and recognition of act of terrorism. *Infect Dis Clin North Am* 20: 273-287.
- Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ and Stull TL (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol* 30: 2084-2087.
- Kutyrev V, Mehigh RJ, Motin VL, Pokrovskaya MS, Smirnov GB and Brubaker RR (1999). Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67: 1359-1367.
- Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoëud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F and Vergnaud G (2001). A tandem Repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 1: 2.
- Leal NC, Abath FG, Alves LC and de Almeida AM (1996). A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38: 371-373.
- Leal, NC. Potencial do uso de PCR e Hibridização com sondas moleculares no estudo *Yersinia pestis*, 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.
- Leal NC and Almeida AMP (1999). Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 41: 339-342.
- Leal NC, Sobreira M, Leal TCA and de Almeida AMP (2000). Homology among extra-cryptic dna bands and the typical plasmids in brazilian *Yersinia pestis* strains. *Braz J Microb* 31: 20-24.
- Leal TC, Leal NC and de Almeida AM (1997). The absence of *Yersinia enterocolitica* in foods and animal reservoirs in areas of the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 193-196.

- Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CV and Almeida AM (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 727-732.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Nascimento MGM, Oliveira MBM, Balbino VQ and Almeida AMP (2006). The pgm locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. Genet Mol Biol 29: 126-131.
- Leal-Balbino TC, Leal NC, Sobreira M and Almeida AMP (2009). Peste e Tularemia. In: Marcondes, C.B. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. Atheneu, Rio de Janeiro, 69-83.
- Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Anisimov AP, Yang R and 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.
- Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y, Guo Z, Pourcel C, Liang Y, Hou X, Wang Y, Cui Z, Zhang Z, Zhu X, Xia L, Shen X, Cai H, Wang J et al. (2010). Genome rearrangements of completely sequenced strains of *Yersinia pestis*. J Clin Microbiol 48: 1619-1623.
- Loïez C, Herwegh S, Wallet F, Armand S, Guinet F, Courcol RJ (2003). Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. J Clin Microbiol 41: 4873-4875.
- Losada L, Varga JJ, Hostetler J, Radune D, Kim M, Durkin S, Schneewind O and Nierman WC (2011). Genome sequencing and analysis of *Yersinia pestis* KIM D27, an avirulent strain exempt from select agent regulation. PLoS One 6: e19054.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC and Gage KL (2005) Identifying sources of human exposure to plague. J Clin Microbiol 43: 650-656.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI and Koonin EV (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct 1:7.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF et al. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 9: 467-477.

- Marraffini LA and Sontheimer EJ (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* 11: 181-190.
- Merhej V, Adékambi T, Pagnier I, Raoult D and Drancourt M (2008). *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 779-784.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J and Soria E (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60: 174-182.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E and Juez G (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36: 244-246.
- Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, Feldkamp M, Kusecek B, Vogler AJ, Li Y et al. (2010). *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat Genet* 42: 1140-1143.
- Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, Slezak TR, Sokhansanj BA, Regala WM, Brubaker RR et al. (2002). Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J Bacteriol* 184: 1019-1027.
- MS/SVS - Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde (2005). Guia de vigilância epidemiológica (Série A. Normas e Manuais Técnicos). 6nd edition. Ministério da Saúde, Brasília, 816.
- Murros-Konttinen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Johansson P, Rahkila R and Björkroth J (2011a). *Yersinia nurmii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2368-2372.
- Murros-Konttinen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H and Björkroth J (2011b). *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2363-7.
- Nakamura Y, Julier C, Wolff R, Holm T, O'Connell P, Leppert M and White R (1987). Characterization of a human 'midisatellite' sequence. *Nucleic Acids Res* 15: 2537-2547.
- Norkina OV, Kulichenko AN, Gintsburg AL, Tuchkov IV, Popov YuA, Aksenov MU and Drosdov IG (1994). Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol.* 76: 240-245.
- Olive DM and Bean P (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microb* 37: 1661-1669.

- Oliveira MBM, Barros MPS, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, Balbino VQ, Leal NC, Almeida AMP and Leal-Balbino TC (*in press* 2012). The Genetic Diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet Mol Res in press* 2012.
- Perry RD and Fetherston JD (1997). *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10: 35-66.
- Pollitzer R (1954). History and present distribution of plague in: plague. *Monogr Ser World Health Organ* 22: 11-45.
- Pouillot F, Derbise A, Kukkonen M, Foulon J, Korhonen TK and Carniel E (2005). Evaluation of O-antigen inactivation on Pla activity and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* harbouring the pPla plasmid. *Microbiology* 151: 3759-3768.
- Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F and Vergnaud G (2004). Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* 4: 22.
- Pourcel C, Salvignol G and 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.
- Prentice MB and Rahalison L (2007). Plague. *Lancet* 369: 1196-1207.
- Price EP, Smith H, Huygens F and Giffard PM (2007). High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 73: 3431-3436.
- Protsenko OA, Filippov AA and Kutyrev VV (1991). Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome. *Microb Pathog* 11: 123-128.
- Qu S, Shi Q, Zhou L, Guo Z, Zhou D, Zhai J and Yang R (2010). Ambient stable quantitative PCR reagents for the detection of *Yersinia pestis*. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e629.
- Regulamento Sanitário Internacional (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organização Mundial de Saúde.
- Riehm JM, Vergnaud G, Kiefer D, Damdindorj T, Dashdavaa O, Khurelsukh T, Zöller L, Wölfel R, Le Flèche P, Scholz HC et al. (2012). *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One* 7: e30624.

- Saavedra Rda C and Dias JP (2011). *Yersinia pestis* infection in the State of Bahia: effective control or epidemiological silence?. Rev Soc Bras Med Trop 44: 223-227.
- Schuenemann VJ, Bos K, DeWitte S, Schmedes S, Jamieson J, Mittnik A, Forrest S, Coombes BK, Wood JW, Earn DJ et al. (2011). Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the pPCP1 plasmid of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. Proc Natl Acad Sci USA 108: e746-752.
- Shen X, Wang Q, Xia L, Zhu X, Zhang Z, Liang Y, Cai H, Zhang E, Wei J, Chen C et al. (2010). Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China. J Bacteriol 192: 3551-3552.
- Silva, AC (2004). Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do Estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS100. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- Silveira-Filho, VM. Caracterização molecular dos fatores de transmissão / patogenicidade e tipagem de cepas de *Yersinia pestis* isoladas no Foco do Nordeste do Brasil, 2012. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- Sobreira, MBS (2003). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of different bacteria. Rev Inst Med Trop 45: 68.
- Song Y, Tong Z, Wang J, Wang L, Guo Z, Han Y, Zhang J, Pei D, Zhou D, Qin H, Pang X et al. (2004). Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. DNA Res 11: 179-197.
- Sprague LD, Scholz HC, Amann S, Busse HJ and Neubauer H (2008). *Yersinia similis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 58: 952-958.
- SRP (2011). Serviço de Referência em Peste (CPqAM/Fiocruz). Comunicação Pessoal.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat C, Gage KL, Leirs H and Rahalison L (2008). Plague: past, present and future. PLoS Medicine 5: 9-13.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM and Petes TD (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature 365: 274-276.
- Sulakvelidze A (2000). *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. Microbes Infect 2: 497-513.

- Sun W, Roland KL and Curtiss R (2011). Developing live vaccines against plague. *J Infect Dev Ctries* 5: 614-627.
- Tavares C, Aragão AI, Leal NC, Leal-Balbino TC, de Oliveira MB, de Oliveira Gonçalves Ferreira GM and de Almeida AM (2012). Plague in Brazil: from now and then. *Adv Exp Med Biol* 954: 69-77.
- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T et al. (2006). The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* 2: e206.
- Touchman JW, Wagner DM, Hao J, Mastrian SD, Shah MK, Vogler AJ, Allender CJ, Clark EA, Benitez DS, Youngkin DJ et al. (2007). A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. *PLoS One* 2: e220.
- van Belkum A, Scherer S, van Leeuwen W, Willemsse D, van Alphen L and Verbrugh H (1997). Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 65: 5017-5027.
- van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M and Brouns SJ (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 34: 401-407.
- Wang X, Li Y, Jing H, Ren Y, Zhou Z, Wang S, Kan B, Xu J and Wang L (2011). Complete genome sequence of a *Yersinia enterocolitica* "Old World" (3/O:9) strain and comparison with the "New World" (1B/O:8) strain. *J Clin Microbiol* 49: 1251-1259.
- WHO (2010). Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004–2009. *Weekly epidemiological Record* 85: 40-48.
- WHO. Plague in the Americas. Scientific Publication 115: 1965.
- Xia X, Zhao S, Smith A, McEvoy J, Meng J and Bhagwat AA (2009). Characterization of Salmonella isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *Int J Food Microbiol* 129: 93-98.
- Zhou D, Tong Z, Song Y, Han Y, Pei D, Pang X, Zhai J, Li M, Cui B, Qi Z et al. (2004). Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J Bacteriol* 186:5147-5152.

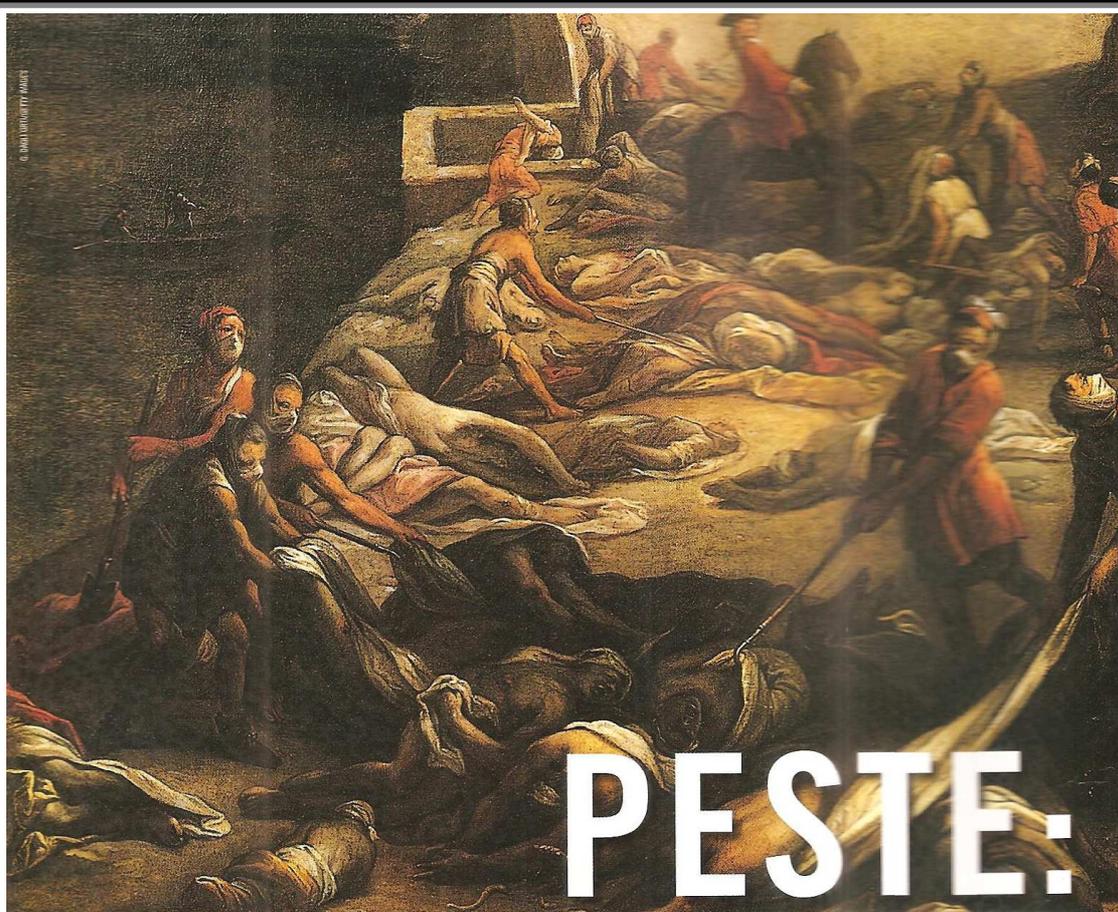
10 ANEXO

Título: Peste: uma doença do passado?

Autores: França, Camila Tenorio; **Barros, Maria Paloma Silva**; Leal-Balbino, Tereza Cristina; Almeida, Alzira Maria Paiva; Oliveira, Maria Betânia Melo.

Revista: Ciência Hoje



**CAMILA TENDRIO 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*

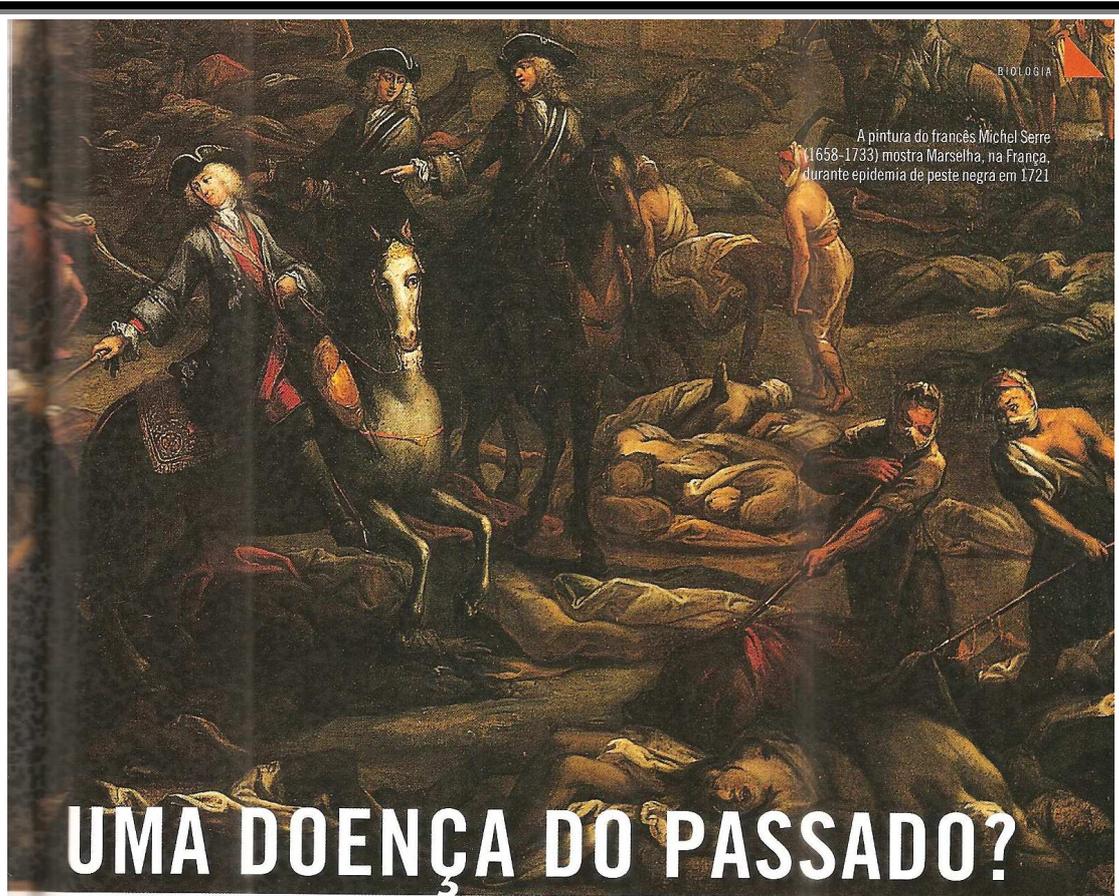
ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA

*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*

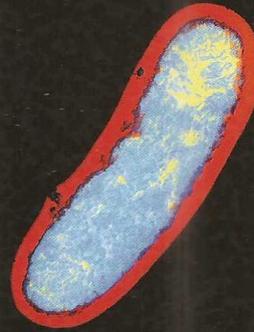


Figura 2. Bacilo *Yersinia pestis*

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 linces, 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- >>>



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



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.

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

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 melhor 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.

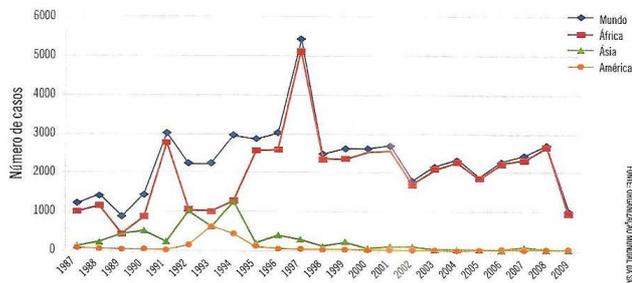


Figura 5. Número de casos de peste humana registrados entre 1987 e 2009 no mundo

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.

11 CURRÍCULO LATTES

Maria Paloma Silva de Barros

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

2008 Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Caracterização genotípica de cepas brasileiras de *Yersinia pestis*
Orientador: Tereza Cristina Leal Balbino
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Formação complementar

2011 - 2011 Treinamento em laboratório de Biossegurança 3..
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil

Atuação profissional

1. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - CPQAM

2008 - Atual	Vínculo: Estudante de Doutorado , Enquadramento funcional: Estudante , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
2007 - 2008	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Cooperação Técnica , Carga horária: 40, Regime: Integral

Projetos

Projetos de pesquisa

2011 – 2013 Estudo Epidemiológico e Molecular de *Staphylococcus aureus* metilina resistente isolados de amostras clínicas adquiridos em Hospitais Públicos.

Situação: Em andamento

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Tereza Cristina Leal Balbino (Responsável); Maria Paloma Silva de Barros; Valdir de Queiroz Balbino; Vladimir da Mota Silveira Filho; Maria Betânia Melo de Oliveira; Mariana Andrade.

2010 - 2012 Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes isolados de amostras clínicas.

Descrição: Este projeto tem como objetivo, aplicar métodos moleculares na identificação, caracterização de fatores de virulência e resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar de *S. aureus* de origens diversas, além da aplicação destes métodos na epidemiologia molecular e estabelecer a relação clonal entre elas, visto que no Brasil poucos trabalhos nesta área foram realizados.

Situação: Em andamento

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Tereza Cristina Leal Balbino (Responsável); Maria Paloma Silva de Barros; Valdir de Queiroz Balbino; Vladimir da Mota Silveira Filho; Mariana

Andrade; Felipe Lira de Sá Cavalcanti; Thiago André Ramos dos Santos; Ana Carolina Melo.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

2009 - 2014 Aplicação de marcador molecular para estudo epidemiológico de cepas brasileiras de *Yersinia pestis*

Descrição: O objetivo deste projeto é realizar uma caracterização genética de cepas de *Y. pestis* obtidas de diferentes focos naturais de peste do Brasil, de diferentes períodos e hospedeiros e investigar se houve modificações no genoma desta bactéria através dos anos em consequência da adaptação ao ambiente. Estabelecer correlações entre os resultados dos estudos genéticos e dados epidemiológicos e alimentar uma base de dados com características genéticas das cepas de *Y. pestis* brasileiras. Esta investigação será realizada pela tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* usando a técnica da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), MLVA e pela técnica CRISPR. Os marcadores serão selecionados para estabelecer a relação entre as cepas e comparados com os dados epidemiológicos conhecidos (fonte de isolamento, local, período). O grau de homologia entre as amostras, obtido pelas técnicas, será determinado pelo coeficiente de Dice, e os coeficientes de correlação e agrupamento serão calculados por UPGMA. Para representação hierárquica das ligações entre os isolados. Será desenhado dendrogramas pelo programa GelCompar II (Applied Maths, Inc). O sequenciamento crispr será realizado no seqüenciador ABI 3100 (Applied Systems), usando o Bigdye Kit (Applied Biosystems). As seqüências obtidas serão analisadas e depositadas no genbank, através dos programas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), Seq Tools v. 8.3.022 (<http://www.seqtool.dk>) e Bio Edit V. 7.0.5.2.

Situação: Em andamento

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Tereza Cristina Leal Balbino (Responsável); Maria Paloma Silva de Barros; Valdir de Queiroz Balbino; Vladimir da Mota Silveira Filho; Maria Betânia Melo de Oliveira; Mariana Andrade; Rosanny Holanda Freitas B. Lins.

2008 – 2013 Caracterização Genética de cepas de *Yersinia pestis*

Descrição: Identificar e analisar, estruturalmente, os locos CRISPRs em cepas brasileiras de *Y. pestis*; Realizar tipagem molecular das cepas de *Y. pestis* através do PFGE e CRISPR, a fim de inferir relações genéticas entre elas; Investigar se existe diversidade genética entre as cepas de *Y. pestis* isoladas de diversos focos do Brasil; Comparar os perfis genotípicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, gerados pelo PFGE e CRISPR, com cepas estrangeiras e com outras espécies de *Yersinia*; Correlacionar os dados moleculares com a distribuição geográfica de cada isolado de *Y. pestis*; Avaliar e comparar as técnicas CRISPR e PFGE como marcadores genéticos para genotipagem das cepas de *Y. pestis*..

Situação: Em andamento

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Tereza Cristina Leal Balbino (Responsável); Maria Paloma Silva de Barros; Valdir de Queiroz Balbino; Vladimir da Mota Silveira Filho; Maria Betânia Melo de Oliveira; Mariana Andrade; Rosanny Holanda Freitas B. Lins.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. FRANÇA, C.T., BARROS, M. P. S., LEAL-BALBINO, T.C., ALMEIDA, A.M.P., OLIVEIRA, M. B. M. Peste: Uma doença do passado? *Ciência Hoje*, 2012.

2. BARROS, M. P. S., SILVEIRA-FILHO, V.M, LINS, R.H.F.B., OLIVEIRA, M. B. M., ALMEIDA, A.M.P., BALBINO, LEAL-BALBINO, T.C. Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genetics and Molecular Research*, 2012.

3. OLIVEIRA, M. B. M., BARROS, M. P. S., SILVEIRA-FILHO, V.M., ARAÚJO-NEPONUCENO M.R., BALBINO, V.Q., LEAL, N.C., ALMEIDA, A.M.P., LEAL-BALBINO, T.C. The genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genetics and Molecular Research* , 2012.

Capítulos de livros publicados

1. OLIVEIRA, M. B. M., BARROS, M. P. S., Silveira-Filho, V.M, Filho-Araújo, JL, Tereza Cristina Leal Balbino, Leal, NC. Biossegurança em Laboratórios In: Tópicos de Biossegurança.1 ed.Recife : Universitária / UFPE, 2010, v.1, p. 81-102.

2. Calazans, G., Silveira-Filho, V.M, BARROS, M. P. S. Ética e Qualidade em Biossegurança e Biosseguridade In: Tópicos de Biossegurança.1 ed.Recife : Universitária / UFPE, 2010, v.1, p. 227-244.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. FRANÇA, C.T., BARROS, M. P. S., OLIVEIRA, M. B. M., ALMEIDA, A.M.P. Análise de Sequências Espaçadoras (CRISPR) em Cepas de *Yersinia pestis* In: 15 Jornada de Iniciação Científica da FACEPE, 2011, Recife.

2. BARROS, M. P. S., SILVEIRA-FILHO, V.M, LINS, R.H.F.B., FRANÇA, C.T., SANTOS, M. D. V., OLIVEIRA, M. B. M., ALMEIDA, A.M.P., LEAL-BALBINO, T.C. Caracterização genética de cepas de *Yersinia pestis*. 2011. In: 26 Congresso Brasileiro de Microbiologia., 2011, Foz do Iguaçu.

3. FRANÇA, C.T., SILVA, E.J., BARROS, M. P. S., ALMEIDA, A.M.P. Caracterização intraespecífica de cepas de *Yersinia pestis* através de sequências espaçadoras (CRISPR). In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, São Paulo.

4. BARROS, M. P. S., SILVEIRA-FILHO, V.M, OLIVEIRA, M. B. M., LINS, R.H.F.B., SILVA, E.J., FRANÇA, C.T., LEAL, N.C., BEZERRA, M.S., ALMEIDA, A.M.P., BALBINO, V.Q., LEAL-BALBINO, T.C. EVALUATION OF THE MOLECULAR METHODS EMPLOYED FOR TYPING BRAZILIAN *Yersinia pestis* STRAINS In: 10th International Symposium on *Yersinia*, 2010, Recife.

5. FRANÇA, C.T., BARROS, M. P. S., OLIVEIRA, M. B. M., ALMEIDA, A.M.P. Identificação e Caracterização Estrutural dos Loci CRISPRs em cepas de *Yersinia Pestis* In: XVII Reunião Anual de Iniciação Científica da Fiocruz-PE (RAIC), 2010, Rio de Janeiro.

6. BARROS, M. P. S., BENVIDES, R.H.F., SILVEIRA-FILHO, V.M., ALMEIDA, A.M.P., LEAL-BALBINO, T.C. Estudo epidemiológico-molecular de cepas brasileiras de *Yersinia pestis* pela eletroforese em gel de campo pulsado In: XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia, 2008, Porto Alegre.

Apresentação de trabalho e palestra

1. BARROS, M.P.S., OLIVEIRA, M.B.M., LEAL-BALBINO, T.C. Caracterização genética de cepas de *Yersinia pestis* . I Jornada de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2011.

2. SANTOS, M.D.V., FRANÇA, C.T., BARROS, M. P. S., LEAL-BALBINO, T.C., ALMEIDA, A.M.P., OLIVEIRA, M. B. M. Análise de locos CRISPR em cepas brasileiras de *Yersinia pestis*, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. BARROS, M. P. S.
Capacitação em Biossegurança e Gestão Ambiental, 2011. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
2. BARROS, M. P. S.
Métodos Moleculares: Princípios e Aplicações, 2011. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
3. BARROS, M. P. S.
Sondas de DNA e aplicações, 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
4. BARROS, M. P. S.
Aplicação da técnica Pulsed Field Electrophoresis Gel (PFGE) em estudo epidemiológico de cepas brasileiras de *Yersinia pestis*, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Co-orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Milena Danda Vasconcelos Santos. **ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS ESPAÇADORAS (CRISPR) EM CEPAS DE *Yersinia pestis***. 2011. Curso (Farmácia) - Faculdade Pernambucana de Saúde
2. Camila Tenorio França. **CHARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LOCI CRISPRs (CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS) EM CEPAS DE *Yersinia pestis***. 2010. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
3. Ednaldo José da Silva. **Genotipagem de cepas de *Yersinia pestis* através de sequências espaçadoras (CRISPR)**. 2010. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Iniciação científica

1. Milena Danda Vasconcelos Santos. **ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS ESPAÇADORAS (CRISPR) EM CEPAS DE *Yersinia pestis***. 2011. Iniciação científica - Faculdade Pernambucana de Saúde
2. Camila Tenorio França. **CHARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LOCI CRISPRs (CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS) EM CEPAS DE *Yersinia pestis***. 2010. Iniciação científica- Universidade Federal de Pernambuco
3. Ednaldo José da Silva. **Genotipagem de cepas de *Yersinia pestis* através de sequências espaçadoras (CRISPR)**. 2010. Iniciação científica-Universidade Federal Rural de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

- I Jornada da Pós-Graduação em Genética/UFPE, 2011. Caracterização genética de cepas de *Yersinia pestis*.
- 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011. Análise de locos CRISPR em cepas

brasileiras de *Yersinia pestis*.

26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011. Caracterização genética de cepas de *Yersinia pestis*.

10th International Symposium Yersinia 2010 - 10th International Symposium, 2010. Evaluation of molecular methods employed for typing brazilian *Yersinia pestis* strains.

I Workshop Interno do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz Pernambuco, 2010. CPqAM/FIOCRUZ.

X curso Internacional de Epidemiologia Molecular em Doenças Infecciosas e Parasitárias Emergentes, 2010.

Treinamento para Atividades em NB3, 2009 e 2011.

Introdução ao Programa BioNumerics, Plataforma de Software para Análise de Dados Biológicos, 2009. .

XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia, 2008. Estudo epidemiológico-molecular de cepas brasileiras de *Yersinia pestis* pela eletroforese em gel de campo pulsado.

Curso de Fortalecimento das Ações em Biossegurança dentro de um protocolo de Biossegurança atendimento de demandas regionais nos países Latino- Americanos, 2008.

I Simpósio Pernambucano de Biossegurança, 2008.

Organização de evento

1. BARROS, M. P. S., SILVEIRA-FILHO, V.M., OLIVEIRA, M. B. M. **II Simpósio Pernambucano de Biossegurança**, 2011.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. BARROS, T. F., LEAL-BALBINO, T.C., ANDRADE, M.A., BARROS, M. P. S. Participação em banca de Thiago Ferreira de Barros. **Investigação do perfil de resistência antimicrobiana e caracterização molecular das exotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**, 2010. (Ciências Biológicas) Faculdade Franssinete do Recife

2. BARROS, M. P. S., ANDRADE, M.A., LEAL-BALBINO, T.C. Participação em banca de Camilla Albertina Dantas de Lima. **Tipagem molecular de *Staphylococcus* isolados de amostras clínicas em um hospital público da cidade do Recife - PE**, 2008 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco