



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS
DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS
BACTERIANOS

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

RECIFE / PE – BRASIL
2002

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

**ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS
DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nilma Cintra Leal

**RECIFE / PE – BRASIL
2002**

**Trabalho desenvolvido no
Departamento de Microbiologia do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães (FIOCRUZ/MS) com o
suporte financeiro do PAPES II-
FIOCRUZ (Ref. 25250384), do CNPq
(Proc. 141362/98-7) e da FACEPE.**

Ao meu Pai,

*Não a memória, mas à história
da pessoa mais humana que
conheci, que ao viver se fez
exemplo.*

*Por trilhar os caminhos por você
ensinados cheguei até aqui.*

À minha Mãe,

O meu porto seguro.

Dedico esta conquista.

ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS BACTERIANOS

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
CPqAM/FIOCRUZ – PE (Orientadora)

Profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki
UNICAP- PE

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal
CPqAM/FIOCRUZ – PE

Profa. Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
CPqAM/FIOCRUZ – PE

Prof. Dr. Marcelo Magalhães
LIKA – UFPE

Profa. Dra. Elza Luna
UFPE

Profa. Dra. Célia Maria B. Castro
LIKA – UFPE

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	01
Objetivo geral	02
Objetivos específicos	02
Revisão da literatura	03
Tipagem Molecular.....	03
Métodos baseados nos Ácidos Nucléicos.....	04
Perfil de restrição do DNA genômico e plasmidial.....	04
Sondas derivadas de seqüências de inserção.....	05
Análise do RFLP do DNA ribossomal.....	06
Métodos de tipagem baseados na PCR.....	07
RAPD-PCR.....	07
Ribotipagem-PCR.....	07
Aplicações dos métodos de tipagem.....	08
<i>Staphylococcus aureus</i>	08
Epidemiologia e tipagem em <i>Staphylococcus aureus</i>	08
O gênero <i>Providencia</i>	09
Epidemiologia e tipagem em <i>Providencia alcalifaciens</i>	10
O gênero <i>Yersinia</i>	13
História da peste.....	15
Epidemiologia e tipagem em <i>Yersinia pestis</i>	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ARTIGOS	28
ARTIGO I: Typing of human and bovine <i>Staphylococcus aureus</i> by RAPD-PCR and ribotyping-PCR.....	29
ARTIGO II: Ribotipagem-PCR de isolados clínicos de <i>Providencia alcalifaciens</i>	35
ARTIGO III: Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em amostras de yersínias patogênicas.....	51
CONCLUSÕES	78
PERSPECTIVAS	79
ANEXOS	80
Normas para publicação	
Journal of Medical Microbiology.....	81
Journal of Clinical Microbiology.....	84

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e de forma especial:

- À Dra. Alzira Almeida por sua orientação, confiança, amizade, incentivo, compreensão e apoio recebido durante todas as etapas deste trabalho, e sobretudo exemplo de competência e profissionalismo, minha grande admiração.
- À Dra Nilma Leal, minha co-orientadora, que me iniciou no “mundo” científico, obrigada pela parceria, amizade, competência e ensinamentos recebidos ao longo de todos esses anos.
- Ao Dr. Marcelo Magalhães pelo fornecimento de parte das culturas utilizadas neste estudo, pela amizade e apoio constante.
- Ao Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, ex-diretor, e ao Dr. José Luiz de Lima Filho, atual diretor, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) pela concessão do afastamento das minhas atividades na Instituição, desta forma contribuindo para o melhor desempenho deste trabalho.
- Ao Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, diretor no período da execução do trabalho e ao Dr. Rômulo Maciel Filho, atual diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), por facultar o uso das instalações dessa Instituição.
- À Coordenação do Doutorado em Ciências Biológicas (UFPE), Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. de Coelho pelo empenho na condução do curso, e às secretárias Adenilda Eugênia, Jacilene Duarte e Liane Salomé pela disponibilidade e apoio.
- Ao corpo docente do Doutorado em Ciências Biológicas (UFPE), pelos ensinamentos e contribuição na minha formação profissional.

- À Profa. Dra. Laíse de Holanda, revisora deste trabalho, e aos examinadores pela disponibilidade com que aceitaram analisar este trabalho.
- Ao Dr. Osvaldo Pompílio, Pesquisador do Departamento de Microbiologia do CPqAM, pelas sugestões e contribuições.
- À Dra. Tereza Cristina, grande amiga e parceira, presente em todos os meus momentos, pelas contribuições e prazer da convivência.
- À Profa Dra Maria do Socorro Vieira pela amizade e oportunidade de colaboração científica.
- À Silvana Santos, Yara Nakasawa, pela grande amizade, dedicação e efficientíssimo apoio técnico.
- À Isaac, Rita, Edson e Nelson pelo grande suporte técnico.
- A mais nova geração de pesquisadores: Francisco Cariri, grande colaborador na formatação e apresentação deste trabalho, Jemima, Soraya, Raquel, Cláudia, Gerlane, Fabiana e Liciania, com vocês aprendemos mais.
- À Luciana, Virgínia e Lindinalva, bibliotecária e auxiliares do CPqAM, pela eficiente colaboração na aquisição das bibliografias.
- A George, Ulisses, Gisele e toda a equipe do Núcleo de Informática do CPqAM pelo importante apoio e colaboração.
- À Conceição e Joselma pela realização dos trabalhos xerográficos.
- Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE), pelo estímulo e compreensão.
- A todos os colegas do departamento de Microbiologia do CPqAM em especial a amiga Mirna, pela valiosa colaboração.

- À Ilma, Conceição, Maria Helena, Vera Lúcia, Moisés, Paulina, Carmelita, Kilma, Rafael, Celestina, Eliane, Felipe e demais colegas funcionários do LIKA, pela amizade e constante apoio.
- Às amigas Dra. Célia Castro e Graça Antas do Setor de Microbiologia Clínica do LIKA, pelo constante apoio e grande amizade.
- Aos amigos Mineo, Edneide, Kirte, Luis, Fábio, Valéria e demais amigos do CPqAM pela amizade e estímulo.
- A todos os colegas de turma do Curso de Doutorado, em especial “Às meninas”: Marília, Neide, Raquel e Rita pelos bons momentos, convívio, amizade e solidariedade ao longo do curso. E a inesquecível “turma do Mestrado”, Constância e Neide.
- Aos meus amigos pessoais, em especial Silvana, Luciana, Albênia, Fátima, Vilma e Lucineide, pela amizade, solidariedade e compreensão das ausências.
- Ao brilho das crianças: Deborah, Maria Emília, Bione Neto, João Victor e Larissa, meus sobrinhos, fonte de toda a esperança.
- À minha Mãe, aos meus irmãos e a minha família, minha maior torcida, pela paciência, compreensão, carinho e constante estímulo.
- Em especial ao meu companheiro Alex Bernardo, pela solidariedade, compreensão da minha ausência, carinho, amor e estímulo constantes.
- Ao CNPq, PAPES 2-FIOCRUZ e FACEPE, pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1. Distribuição das variedades geográficas (biovar) de <i>Yersinia pestis</i>	26
--	----

ARTIGO I

Tabela 1. Distribution of the <i>Staphylococcus aureus</i> strains according to the RAPD-PCR patterns obtained with the three primers.....	32
Tabela 2. Distribution of the <i>Staphylococcus aureus</i> strains according to the ribotyping-PCR amplification patterns.....	33

ARTIGO II

Tabela 1. Distribuição das amostras de <i>Providencia alcalifaciens</i> nos diferentes ribotipos.....	47
---	----

ARTIGO III

Tabela 1. Origem e características das cepas de <i>Yersinia pestis</i> estudadas.....	69
Tabela 2. Características das cepas de <i>Yersinia enterocolitica</i> analisadas.....	71
Tabela 3. Informações sobre o sequenciamento das ISR-1 e ISR-2 das diferentes cepas de <i>Yersinia pestis</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

FIGURA 1.	Organização e processamento do operon do rRNA.....	27
-----------	--	----

ARTIGO I

FIGURA 1.	RAPD-PCR profiles of amplification from <i>Staphylococcus aureus</i> strains.....	31
FIGURA 2.	Ribotype patterns of the 11 <i>Staphylococcus aureus</i> strains obtained by ribotyping-PCR.....	32

ARTIGO II

FIGURA 1.	Gel de agarose 1,5% das amplificados geradas por Ribotipagem-PCR a partir do DNA extraído.....	48
FIGURA 2.	Gel de agarose 1,5% das amplificados geradas por Ribotipagem-PCR a partir do lisado de colônias.....	49
FIGURA 3.	Géis de agarose 1,5% representativo das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR de cepas de <i>Providencia alcalifaciens</i>	50

ARTIGO III

FIGURA 1.	Géis de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S	73
FIGURA 2.	Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA de cepas de <i>Yersinia enterocolitica</i>	74
FIGURA 3.	Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o primer descrito por Chun et al. (1999).....	75
FIGURA 4.	Géis de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas clivados com as enzimas.....	76
FIGURA 5.	Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas clivados com a enzima <i>Alu I</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

BAB	-Blood Agar Base
BHI	-Brain Heart Infusion
LB	-Luria Bertani
dNTP	-desoxirribonucleotídeo trifosfato
TE	-Tris-HCl 1mM; EDTA 10mM
TBE	-Tris-botrato, ácido bórico, EDTA
pb	-pares de base
PCR	-Polymerase Chain Reaction
RAPD	-Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	-Restriction Fragment Length Polymorphisms
rRNA	-RNA ribossomal
tRNA	-RNA transportador
tRNA ^{Ala}	-RNA transportador de Alanina
tRNA ^{Ile}	-RNA transportador de Isoleucina
tRNA ^{Glu}	-RNA transportador de Glutamina
UFC	-Unidade Formadora de Colônia
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
mM	-Milimolar
ml	-Mililitro
μM	-Micromolar

RESUMO

Os ribossomos bacterianos possuem três tipos de rRNA: 23S, 16S e 5S; codificados por genes organizados em operons separados por regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), que contém um ou mais genes de tRNA. A informação genética derivada do operon do rRNA fornece uma informação taxonômica valiosa, visto que as ISRs, especialmente as que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem menor pressão evolucionária, e assim apresentam maior variação genética que as regiões que codificam os rRNAs. A ribotipagem vem sendo aplicada com sucesso para detectar polimorfismos genéticos entre bactérias. Neste trabalho, analisamos o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR de amostras de *Staphylococcus aureus*, *Providencia alcalifaciens* e das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*, utilizando “primers” desenhados com base em sequências complementares das regiões conservadas 16S e 23S dos genes de rRNA de várias espécies bacterianas. Os padrões de amplificação das ISRs mostraram-se característicos para cada gênero e espécie. Sete perfis de ribotipagem foram observados nas cepas de *S. aureus* e trinta e quatro perfis foram mostrados em *P. alcalifaciens*, evidenciando polimorfismo genético nestas espécies. As cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* analisadas exibiram o mesmo padrão de amplificação, enquanto que as amostras de *Y. enterocolitica* mostraram quatro padrões distintos. Os perfis obtidos foram analisados através das técnicas de sequenciamento e perfil de restrição. Os resultados confirmam a alta homologia entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* que é atribuída a evolução de *Y. pestis*, que se supõe um clone derivado de *Y. pseudotuberculosis*.

Palavras chave: Ribotipagem; *Staphylococcus aureus*; *Providencia alcalifaciens*; *Yersinia*.

ABSTRACT

Bacterial ribosomes carry three types of rRNA: 23S, 16S and 5S encoded in genes organized in operons separated by intergenic spacer regions (ISRs) containing one or more tRNA genes. The genetic information derived from the rRNA operon provides a valuable taxonomic information, since the ISRs, especially those located between the 16S and 23S regions of the rDNAs, suffer lesser evolutionary pressure, then they present greater genetic variation than the regions encoding for the rRNAs. Ribotyping has been applied successfully to detect genetic polymorphism among bacteria. In this work, we analyzed the amplification profile of the ISRs obtained by PCR using primers drawn to complementary sequences of the conserved regions 16S-23S of the rRNA genes from several bacteria species in samples of *Staphylococcus aureus*, *Providencia alcalifaciens* and the three pathogenic species of *Yersinia*. The amplification patterns of the ISRs obtained revealed to be characteristic for each genus and species. Seven ribotyping profiles had been observed among the *S. aureus* strains studied and thirty four profiles in *P. alcalifaciens* evidencing great genetic polymorphism in these species. The strains of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* analyzed displayed the same amplification profile which was different from the *Y. enterocolitica* profile. Four distinct ribotyping profiles were observed in the *Y. enterocolitica* strains analyzed. The profiles obtained from the three species had been analyzed by sequencing and restriction. The results confirmed the high homology between *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*, attributed to the *Y. pestis* evolution, supposed to be a clone derived from *Y. pseudotuberculosis*.

INTRODUÇÃO

Geralmente os agentes causadores de uma infecção em um surto derivam de uma única célula, ou seja são clonais ou altamente relacionados. Os organismos de origem clonal são membros de uma mesma espécie com os mesmos fatores de virulência, e características bioquímicas e genômicas iguais, entretanto apresentam diversidade ao nível de espécie suficiente para diferenciar entre isolados de diferentes origens, diferentes períodos e diversas regiões geográficas, podendo ser subtipados.

As técnicas de tipagem são epidemiologicamente importantes para o monitoramento de surtos de infecções, transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, reconhecimento de clones virulentos, relação clonal entre amostras, e monitoramento através de programas de controle ou erradicação das doenças.

Os métodos de tipagem são subdivididos em fenotípicos, que empregam marcadores fenotípicos, e moleculares que utilizam marcadores moleculares e genéticos. Os marcadores genéticos correspondem aos ácidos nucleicos e são largamente aplicados para análises taxonômicas e epidemiológicas em bactérias. Entre os diversos métodos de tipagem molecular a partir dos ácidos nucleicos destacamos a ribotipagem que corresponde à análise dos genes do DNA ribossomal (rDNA). As bactérias possuem rRNAs 23S, 16S e 5S, os genes dos rRNAs 16S e 23S apresentam regiões muito conservadas que são adequados para análises taxonômicas, e as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), presentes entre os genes 16S-23S, apresentam seqüências variáveis que são apropriadas para avaliações epidemiológicas sendo empregados para tipagens de culturas bacterianas.

Neste trabalho, foi analisado o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR de bactérias patogênicas de interesse regional: *Staphylococcus aureus*, agente de grande importância clínica e econômica por ser causador de um amplo espectro de doenças em animais e humanos; amostras de *Providencia alcalifaciens*, agente causador de gastroenterites e amostras das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*: *Y. pestis*, agente causador da peste, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, enteropatogênicas.

Objetivo geral

Analisar o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR a partir de bactérias patogênicas de interesse regional.

Objetivos específicos

- Analisar o polimorfismo genético em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem animal e humana.
- Avaliar a diversidade genética entre amostras de *Providencia alcalifaciens* isoladas de casos de gastroenterites.
- Analisar as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, para avaliação do polimorfismo genético das ISRs em cada espécie e para análise da evolução molecular de *Y. pestis*.

Revisão da literatura

Tipagem Molecular

A revolução da biologia molecular com a elucidação da estrutura do DNA por Crick & Watson em 1953 permitiu avanços na pesquisa epidemiológica, quando esta ciência passou a incorporar aspectos celulares e moleculares, ampliando os marcadores biológicos e o desenvolvimento da epidemiologia molecular (Hust & Rao, 1993).

Os marcadores biológicos incluem marcadores: bioquímicos, moleculares, genéticos, imunológicos e fisiológicos. O recente aumento de marcadores moleculares e genéticos disponíveis tem facilitado e aumentado o estudo da epidemiologia das doenças infecciosas (Schulte, 1993; Harrison & Griffin, 1993), bem como, o conceito de relação clonal entre isolados de microrganismos de surtos de origem comum. Muitos surtos de infecções resultam da exposição a um agente etiológico de uma mesma fonte. Em geral, os microrganismos infecciosos são clonais, ou seja, eles são originários de uma única célula e são geneticamente idênticos ou apresentam uma baixa diversidade (Swaminathan & Matar, 1993).

Ao nível de espécie as bactérias apresentam uma diversidade genética suficiente para a identificação de diferentes clones ou grupos clonais, entretanto conservam uma similaridade genética elevada, entre isolados de uma mesma espécie, coletados de diferentes fontes, locais e períodos. Os isolados são examinados para várias características que permitam uma discriminação intraespecífica com o objetivo de realizar uma subtipagem (Swaminathan & Matar, 1993).

A subtipagem tem aplicação bacteriológica ampla em saúde pública. É essencial para determinar se clones previamente reconhecidos como virulentos são reconhecidos em uma amostra, para identificar a origem da infecção em um surto, e assegurar que programas de imunização levem à erradicação do patógeno alvo, em vez de atingir formas variantes não patogênicas.

Anteriormente a subtipagem era feita apenas por marcadores fenotípicos, sendo empregados um ou vários marcadores como: biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e bacteriocinotipagem. Estes testes são organismo-

específicos e cada organismo requer o uso de reagentes e procedimentos específicos. Os padrões de resistência a antibióticos, embora baseados em traços fenotípicos, têm sido largamente utilizados para tipar muitos isolados bacterianos, particularmente de infecções hospitalares. A resistência aos antimicrobianos freqüentemente é codificada por DNA plasmidial sendo freqüente a associação entre padrão de resistência e o perfil plasmidial.

Os métodos de tipagem molecular são baseados nas características físicas de moléculas como: ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos entre outras moléculas químicas, produzidas por bactérias e são universalmente aplicáveis. Esses métodos podem ser classificados em três grandes grupos com base no tipo de macromolécula: lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos, proteínas e em ácidos nucléicos.

Métodos baseados nos ácidos nucléicos

O desenvolvimento de técnicas de isolamento, separação, clivagem e sequenciamento de ácidos nucléicos desde 1975, possibilitaram a aplicação destes métodos para vários problemas epidemiológicos.

Perfil de restrição do DNA genômico e plasmidial

Perfil plasmidial

Os plasmídeos são elementos de DNA extracromossomal de replicação autônoma presentes em muitas espécies de bactérias, mas que não são essenciais ao crescimento bacteriano normal, eles podem conter genes que codificam fatores de virulência ou resistência aos antimicrobianos. O perfil plasmidial vem sendo usado como ferramenta para subtipar várias espécies de bactérias. Por outro lado, plasmídeos de tamanhos idênticos podem diferir em seqüências de nucleotídeos, nestes casos a clivagem do DNA plasmidial com enzimas de restrição fornece um perfil plasmidial com grande poder discriminatório, sendo útil para a subtipagem de diferentes espécies bacterianas. Embora o perfil plasmidial seja aplicável em investigações epidemiológicas ele não pode ser aplicado a todas espécies bacterianas.

Muitas bactérias apresentam plasmídeos instáveis ou plasmídeos com baixa heterogeneidade de seqüências de nucleotídeos não sendo úteis para subtipagens (Swaminathan & Matar, 1993).

Análise de restrição do DNA genômico

Este método envolve a comparação do número e tamanho de fragmentos produzidos por digestão do DNA genômico com enzimas de restrição. Variações observadas entre os fragmentos de restrição gerados por uma enzima específica são denominadas Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment length Polymorphism: RFLPs). RFLPs podem resultar de rearranjos, inserção, deleção ou substituição de bases do DNA nos sítios de clivagem das enzimas. A vantagem da análise de restrição do DNA genômico é que diferente do perfil plasmidial ele é universalmente aplicável. Apresenta a desvantagem de gerar numerosos fragmentos de restrição de tamanhos muito próximos impossibilitando a análise. O uso de técnicas de transferência de DNA para suportes como membranas de náilon ou nitrocelulose (Southern blotting) e hibridização com sondas marcadas simplifica a análise dos RFLPs.

As sondas usadas para subtipagem incluem: sondas baseadas em fatores de virulência; sondas derivadas de seqüências de inserção (IS); sondas derivadas de bacteriófagos de DNA; sondas de fragmentos aleatórios do DNA genômico e sondas da região 16S-23S do rRNA (Swaminathan & Matar, 1993).

Sondas derivadas de seqüências de inserção

As seqüências de inserção (IS) são elementos transponíveis de DNA repetitivo que são encontrados em organismos procariotos e eucariotos. A presença desses elementos de DNA repetitivo favorece rearranjos cromossômicos, causando mutações que podem gerar polimorfismos interespecíficos e podem acelerar a evolução das espécies.

Análise do RFLP do DNA ribossomal (rDNA) – Ribotipagem

A ribotipagem baseia-se no padrão de restrição dos genes do rRNA, e vem sendo aplicada com sucesso para detectar polimorfismos genéticos entre as bactérias (Grimont & Grimont, 1986). Todas as células vivas contêm rRNA classificados pela constante de sedimentação (Svedberg ou S). As células procarióticas possuem rRNAs 23S, 16S e 5S que junto a proteínas constituem os ribossomos bacterianos.

Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons formados por três genes que codificam ordenadamente os rRNAs 16S, 23S e 5S separados por uma região espaçadora intergênica (entre cada gene - ISRs), que contém um ou mais genes de tRNA. Esta estrutura é similar nas diversas espécies bacterianas. Um longo precursor é formado e processado por nucleases para liberar os rRNA maduros e os tRNA (Figura 1). O número de operons rRNA nas bactérias varia de 1 a 12 por célula e muitos contêm ISRs semelhantes. O número de cópias está relacionado ao tamanho do genoma e a velocidade de crescimento das bactérias (Grimont & Grimont, 1991). Diversos estudos envolvendo a análise das ISRs são utilizados para análises filogenéticas, taxonômicas e de epidemiologia molecular em diferentes gêneros bacterianos (Kostman *et al.*, 1992; Lobato *et al.*, 1998; Chun *et al.*, 1999).

A filogenia dos seres vivos pode ser estabelecida pela comparação das seqüências de nucleotídeos de cada gene de rRNA que apresentam regiões com seqüências muito conservadas (região invariável), que corresponde às regiões de interação das proteínas ribossômicas com o rRNA, e regiões com seqüências variáveis entre as bactérias. Em especial as ISRs, que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolucionária, logo apresentam uma maior variação genética que as regiões que codificam o rRNA, fornecendo uma informação taxonômica ainda mais valiosa.

Em razão da conservação das seqüências de nucleotídeos dos genes de rRNA ao longo da evolução, uma única sonda construída a partir do rRNA de uma única bactéria (*Escherichia coli*) pode ser usada para hibridizar com os genes correspondentes de qualquer bactéria. Os operons do rRNA podem

conter seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição ou ter estas seqüências nas suas proximidades, gerando um número de fragmentos de restrição igual ou superior ao número de cópias dos operons presentes no cromossoma bacteriano (Grimont & Grimont, 1991).

Métodos de tipagem baseados na PCR

Os métodos que envolvem a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction: PCR) oferecem muitas vantagens sobre os outros métodos de tipagem baseados nos ácidos nucléicos, por serem mais rápidos e necessitarem de poucas células do microrganismo (Mullis & Faloona, 1987). Vários métodos de tipagem baseados na PCR vem sendo utilizados:

RAPD-PCR

A genotipagem pelo polimorfismo de amplificação aleatória do DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA - RAPD) não depende do conhecimento prévio da seqüência do genoma do organismo a ser amplificada, não necessitando de “primers” específicos; apenas nanogramas de DNA são necessários e este não necessita ser fortemente purificado. Envolve a utilização de um único “primer”, de uma seqüência arbitrária, e em condições de baixa estringência, são gerados vários fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos amplificados são resultantes do anelamento do “primer” com seqüências parcialmente homólogas no DNA molde (Welsh & MacClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Ribotipagem-PCR

Esta técnica utiliza-se da organização dos operons do rRNA bacterianos. A amplificação dos genes ribossomais, que codificam o rRNA 16S ou 23S é muito utilizada para identificações ao nível de espécie (Ibraim *et al.*, 1993; Trebesius *et al.*, 1998), entretanto não são úteis para subtipagens. A utilização de “primers” que amplificam a região espaçadora intergênica (ISR), em especial a que está localizada entre os genes que codificam os rRNA 16S e

23S, geram perfis de amplificação que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos (Kostmam *et al.*, 1992; Chun *et al.*, 1999). O RFLP dos produtos de amplificação da Ribotipagem por PCR permite a discriminação entre cepas.

Aplicações dos métodos moleculares de tipagem em diferentes gêneros bacterianos

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, responsável por um amplo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais (Kloos & Sheifer, 1981). É o principal patógeno nosocomial, sendo descrito como agente etiológico significativo em infecções hospitalares; a emergência de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), tem sido o maior problema clínico (Kluytmans *et al.*, 1995). É o mais frequente microrganismo associado às mastites caprina e bovina (Harvey & Gilmour, 1988; Watts, 1988). A mastite bovina causada por *S. aureus* é uma doença de grande importância econômica para a indústria leiteira, pois causa redução na qualidade e na produção do leite, aumento do uso de drogas e serviços veterinários (Raimundo *et al.*, 1999).

Epidemiologia e tipagem em *Staphylococcus aureus*

Os portadores de *S. aureus* desempenham um papel importante na epidemiologia e patogênese da infecção, eles têm sido identificados como importante fator de risco para infecções em pacientes imunocomprometidos tais como: pacientes cirúrgicos, que fazem hemodiálise ou ainda pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou AIDS. O tratamento de portadores nasais de *S. aureus*, constitui uma estratégia preventiva em pacientes de risco (Kluytmans *et al.*, 1995).

A ocorrência de portadores sadios de *S. aureus* em animais é de grande importância no campo da saúde pública e na saúde animal. No Brasil,

linhagens de *S. aureus* foram isoladas de bovinos, aparentemente sadios, em fase de lactação, na pele do úbere e tetas e menos freqüentemente nas fossas nasais (Araújo *et al.*, 1986; Pereira & Siqueira Júnior, 1995).

Atualmente vários sistemas de tipagem são usados para monitorar infecções por *S. aureus*. Uma grande variedade de métodos bioquímicos e moleculares, tais como, fagotipagem, padrão de resistência aos antimicrobianos, biotipagem, perfis cromossômicos e plasmidiais de restrição, ribotipagem e análise do padrão eletroforético em campo pulsado vêm sendo usados em investigações epidemiológicas de infecções estafilocócicas humanas e bovinas (Kapur *et al.*, 1995).

Considerando a importância clínica de *S. aureus*, sob os aspectos de saúde humana e animal, sistemas de tipagem são de grande relevância epidemiológica para o reconhecimento do surgimento e origem da infecção, da transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, reconhecimento de cepas virulentas, relação clonal entre amostras, e monitoramento de programas de vacinação (Olive & Bean, 1999).

O gênero *Providencia*

O gênero *Providencia* pertence à família Enterobacteriaceae, tribo Proteeae ou grupo *Proteus-Providencia*. Este gênero sofreu várias alterações taxonômicas. As bactérias do grupo “Providence”, denominação adotada em homenagem à cidade de Providence (Rhode Island, USA), onde foram primeiramente isoladas, foram inicialmente incluídas no gênero *Proteus* por assemelharem-se a *Proteus morganii* e *Proteus rettgeri* em vários aspectos, embora diferissem fortemente de *Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis* (Rustigian & Stuart, 1945). Mais tarde, o termo “Providence” empregado para o grupo foi modificado para *Providencia* (Kauffmann & Edwards, 1952).

O grupo *Proteus-Providencia* é composto de três gêneros: *Proteus*; *Morganella* e *Providencia* (Brenner *et al.*, 1978) e com exceção de *Proteus morganii*, ocupa uma posição marginal na família Enterobacteriaceae, cujo percentual de G+C situa-se entre 50 a 58 % nos diferentes gêneros. O conteúdo de G+C em *Providencia* varia de 39 a 42% (Falkow *et al.*, 1962; Coetzee, 1972).

O gênero *Providencia* atualmente é composto de cinco espécies: *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. heimbachae*, das quais as quatro primeiras são reconhecidas como patógenos humanos (Ewing, 1986). Estas espécies são mais comumente associadas com infecções do trato urinário na comunidade sadia e em pacientes cateterizados e isoladas de fezes diarréicas. Entretanto, podem causar infecções oportunistas variadas em pacientes hospitalizados, tais como infecções em queimaduras, septicemia, infecções de lesões cutâneas ou de ferimentos cirúrgicos e tromboflebite supurativa. As espécies deste gênero podem ser distinguidas bioquimicamente pela prova da urease e pelos testes de fermentação do adonitol, inositol, trealose, arabinose e galactose, entre outros. Apresentam antígenos termoestáveis da parede celular ou somáticos (O), flagelares (H), e antígenos de envoltório ou cápsula (K) (Penner *et al.*, 1979a, 1979b; Penner, 1984).

Epidemiologia e tipagem em *Providencia alcalifaciens*

P. alcalifaciens pode ser isolada de indivíduos sadios, por meio de métodos rotineiros empregados nos exames de espécimes fecais, sendo portanto questionado se esta bactéria é de fato o agente causador das diarréias ou se é um comensal que surge durante infecções causadas por vírus ou outros agentes bacterianos (Carpenter, 1964).

O interesse clínico em *P. alcalifaciens* aumentou depois de um estudo de caso-controle realizado em dois grupos de pacientes britânicos, um com diarréia e história de viagem anterior recente a países em desenvolvimento e outro com diarréia mas sem referir viagem para esses países; foi significativa a incidência de isolamento de *P. alcalifaciens* no primeiro grupo, sendo considerada o agente causador da “Diarréia dos Viajantes Britânicos” (Haynes & Hawkey 1989). Outro estudo caso-controle realizado com crianças indica uma associação significativa de *P. alcalifaciens* com a diarréia infantil (Albert *et al.*, 1998).

Atualmente, o papel de *P. alcalifaciens* como agente causador da gastroenterite foi comprovado em virtude do seu isolamento a partir de amostras de fezes diarréicas de um grande surto de infecção alimentar ocorrido entre crianças e professores de escolas da cidade de Fukui no Japão,

consistindo no primeiro relato de um surto de infecção alimentar atribuído a *P. alcalifaciens* (Murata *et al.*, 2001).

No Brasil, *P. alcalifaciens* vem sendo algumas vezes encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarréicas de pacientes na ausência de outros patógenos intestinais (Guth & Perrella, 1996; Magalhães *et al.*, 1996).

A transmissão se dá por via oral, pela ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes, e o sorogrupo mais comum é o O:3.

Os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade em *P. alcalifaciens* ainda são pouco conhecidos. Vários estudos demonstram a habilidade invasiva em células como mecanismo de virulência deste organismo (Albert *et al.*, 1992; 1995; Mathan *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 2001), entretanto esta característica não é demonstrada por todos os isolados de origem diarréica (Guth & Perrella, 1996).

Magalhães *et al.* (1996), observaram a correlação entre a invasividade, e a presença de um plasmídeo de 45 a 50 kb. Na análise das culturas isoladas do surto de infecção alimentar no Japão também foi observada a correlação de um plasmídeo grande com o potencial invasivo das culturas, entretanto uma cultura sem o referido plasmídeo apresentou menor grau de invasividade, sendo questionada a correlação total da invasividade com a presença do plasmídeo (Murata *et al.*, 2001). Outros estudos confirmaram a habilidade invasiva, entretanto, não demonstram nenhuma correlação entre a presença do plasmídeo de 45-50 kb e a invasividade, e questionam o papel dos plasmídeos na patogenicidade de *P. alcalifaciens* (Guth & Perrella, 1996; Sobreira *et al.*, 2001). Portanto, a presença de outros mecanismos de virulência, e o papel de *P. alcalifaciens* na diarréia necessitam ser esclarecidos.

P. alcalifaciens é bacilo gram-negativo, móvel com flagelos peritríquios e apresenta 46 antígenos O (Penner, 1979a). As culturas são classificadas em dois biogrupos, tomando-se como base a produção de gás da glicose e a fermentação do adonitol e inositol: cepas do biogrupo 1 produzem gás da glicose, fermentam adonitol mas a fermentação de inositol é variável e as culturas do biogrupo 2 não produzem gás da glicose, fermentam adonitol mas não o inositol (Ewing *et al.*, 1972). Os biogrupos 1 e 2 distinguem-se em dois zimotipos, A₁ e A₂, quanto ao perfil eletroforético da β -esterase e da fosfatase

ácida (Picard *et al.*, 1991). Esta subclassificação foi confirmada por hibridização DNA/DNA (Brenner *et al.*, 1978). Através de hibridização DNA/DNA, a homologia entre as bactérias do zimotipo A₁ é de 89 a 100% a 60°C, enquanto que a homologia do zimotipo A₂ é de apenas 74 a 76% confirmando a existência de dois grupos (Brenner *et al.*, 1978; Wayne *et al.*, 1987). Pelo polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) do DNA ribossomal (rDNA), também se distinguem dois ribogrupos A₁ e A₂ (Wayne *et al.*, 1987). Estes resultados põem em dúvida a existência de uma única espécie e sugerem a existência de duas espécies dentro da atual *P. alcalifaciens* (Picard *et al.*, 1991). Outros estudos de análise do perfil de restrição do rDNA em culturas de um mesmo Biogrupo evidenciam a existência de dois ribogrupos com diferentes ribotipos dentro de um mesmo biogrupo (Guth *et al.*, 1999; Pignato *et al.*, 1999), demonstrando um polimorfismo genético na espécie.

A heterogeneidade genética de *P. alcalifaciens* é reforçada pela presença de perfis plasmidiais heterogêneos, que inclui desde cepas sem plasmídeos a cepas com cinco plasmídeos, além do polimorfismo no padrão de RAPD-PCR e uma heterogeneidade de ribotipos identificados através da análise combinada de padrões de ribotipagem obtidos com três enzimas de restrição (Guth *et al.*, 1999; Sobreira *et al.*, 2001).

Através da ribotipagem em isolados de origem diarréica da cidade de São Paulo, foram identificados dois grupos dentro de um mesmo biotipo e observado que amostras invasivas apresentam padrões de ribotipagem distintos das amostras não invasivas representando clones específicos que são distribuídos endemicamente (Guth *et al.*, 1999). A relação clonal de amostras invasivas de *P. alcalifaciens* foi também evidenciada em culturas de origem diarréica da cidade do Recife em um estudo através de RAPD-PCR. Estes resultados sugerem que amostras invasivas e não invasivas são originadas de clones distintos, existindo uma linhagem clonal responsável pelo potencial invasivo em *P. alcalifaciens* (Sobreira *et al.*, 2001).

Por outro lado, uma análise realizada em culturas isoladas de um surto de infecção alimentar no Japão, revela uma grande homogeneidade entre as culturas através de PFGE (Murata *et al.*, 2001), esta diferença deve-se ao fato de que as culturas analisadas em estudos anteriores correspondem a isolados de casos esporádicos de gastroenterite e os isolados obtidos a partir de um

surto de infecção alimentar são originários de uma mesma fonte sendo portanto clonais.

O gênero *Yersinia*

O gênero *Yersinia* foi proposto por Van Loghem (1944) para separar *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* do gênero *Pasteurella* por diferirem na reação de oxidase e na composição das bases do DNA (Mollaret & Thall, 1974); pertence a família Enterobacteriaceae e atualmente é composto de onze espécies das quais três são patógenos humanos e de animais: *Y. pestis* o agente causador da peste, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que são enteropatógenos. O conteúdo de G+C varia de 46-50 mol % entre as espécies do gênero.

Resultados de hibridização de DNA-DNA (Bercovier *et al.*, 1980) mostraram que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são fortemente relacionadas por apresentarem mais de 90% de homologia, contra apenas 48% entre essas duas espécies e *Y. enterocolitica*. Em virtude destas semelhanças foi proposto que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* fossem reclassificadas em uma só espécie com duas subespécies: *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pseudotuberculosis* e *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pestis* (Bercovier *et al.*, 1980). Entretanto, devido às diferenças quanto ao ciclo de transmissão, quadro clínico, nível de patogenicidade e de biossegurança a separação das duas espécies foi mantida. A comparação de seqüências de genes homólogos como os genes do rRNA 16S, genes reguladores e genes estruturais do lipopolissacarídeo (LPS), de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* revela uma similaridade na seqüência de nucleotídeos de 97 a 99,7% (Ibraim *et al.*, 1993, Achtman *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que *Y. pestis* é um clone de uma cepa de *Y. pseudotuberculosis*, provavelmente sorotipo O:1b, que surgiu entre 1.500 a 20.000 anos atrás, pouco antes da primeira pandemia de peste (Achtman *et al.*, 1999; Skurnik *et al.*, 2000).

A razão das diferenças na virulência dessas duas espécies vem sendo alvo de muitos estudos. A patogenicidade nestas três espécies depende em grande parte de um plasmídeo comum o pYV (~70 kb), que codifica a dependência ao cálcio para crescimento a 37°C, uma adesina (YadA), uma

lipoproteína (YlpA), várias proteínas com propriedades antifagocítica (Yop), um sistema secretor das Yops (Ysc), proteínas chaperones específicas para as Yops (Syc) e um sistema regulatório (Lcr) (Cornelis, 2000). Em *Y. pestis* o gene *yadA* encontra-se inativado por uma mutação (Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Além deste plasmídeo, as cepas típicas de *Y. pestis* abrigam mais dois plasmídeos de virulência: o pFra (100 kb), codifica uma proteína capsular imunogênica (F1) e a toxina murina, envolvida na transmissão pelas pulgas, e o pPst (9,5 kb) que codifica uma protease também envolvida na transmissão (Perry & Fetherston, 1997).

Vários genes cromossômicos presentes nas duas espécies estão ativos em *Y. pseudotuberculosis* mas, mutados em *Y. pestis*. Em *Y. pestis* o LPS apresenta-se rugoso, ou seja desprovido de antígenos O, enquanto que em *Y. pseudotuberculosis* a síntese de antígenos O caracteriza 21 diferentes sorotipos. O locus gênico que codifica a síntese dos antígenos O está presente em *Y. pestis* e apresenta 98,9% de homologia com os genes envolvidos na biossíntese dos antígenos O de cepas de *Y. pseudotuberculosis* sorotipo O:1b. Entretanto, em *Y. pestis* esses genes estão inativados por deleção ou inserção de nucleotídeos (Skurnik *et al.*, 2000). Os genes *inv* e *ail*, envolvidos na invasão em células eucarióticas, estão inativados em *Y. pestis* pela presença de seqüências de inserção (Simonet *et al.*, 1996). A *Y. pestis* não apresenta atividade ureolítica, presente em todas as outras espécies do gênero, entretanto apresenta em seu cromossoma o locus gênico da urease, que abriga os genes estruturais e regulatórios, porém esses genes apresentam mutações espécie específica (Sebbane *et al.*, 2001).

A compreensão dos fatores que diferenciaram *Y. pestis* de *Y. pseudotuberculosis* ao nível molecular e genético podem facilitar o controle da peste e fornecer informações sobre a evolução de microrganismos patogênicos.

História da peste

A peste é uma das doenças que mais causou devastação na história da humanidade; é conhecida desde a antigüidade, acreditando-se que surgiu no Planalto Central Asiático, considerado o "Berço da Peste". Na era pré-Cristã, várias pestilências foram, erroneamente classificadas como peste.

Três grandes pandemias bem caracterizadas foram registradas durante a era Cristã. A primeira pandemia, denominada "Peste de Justiniano" (542-602 d.C) teve início na África Central se estendeu para o Egito e estima-se que chegou a matar 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia ou Peste Negra, teve início na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia. A terceira pandemia ou pandemia Contemporânea, teve seu início na China estendendo-se para Hong Kong em 1894 e de lá se espalhou para os Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Madagascar, através do transporte marítimo (Perry & Fetherston, 1997). Segundo Mollaret (1989), a expansão desta pandemia terminou durante a 2ª Guerra Mundial, quando os antigos navios foram afundados e substituídos por navios modernos à prova de ratos. Contudo, a terceira pandemia deixou focos endêmicos em várias partes do mundo.

A peste chegou ao Brasil em 1899, através do porto de Santos no Estado de São Paulo, durante a última pandemia. Inicialmente infectou várias cidades litorâneas, de onde foi eliminada através de medidas sanitárias adequadas e focalizou-se entre os roedores silvestres, na área rural, principalmente na região Nordeste (WHO, 1965). Os focos atuais estão localizados em áreas rurais dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (Vieira & Coelho, 1998; Almeida *et al.*, 2001).

A peste constitui ainda um problema de saúde pública, persistindo em vários focos naturais em diferentes países da África, Ásia e Américas. Enquadra-se entre as doenças de notificação obrigatória a nível internacional e sujeita a quarentena (classe I do regulamento Sanitário Internacional), fazendo-se necessária a vigilância permanente nas áreas de foco. Atualmente a peste está classificada pela OMS como uma doença reemergente, pelo aumento da

incidência mundial de casos humanos e ocorrência de epidemias em vários países como Índia, Peru, Equador, Madagascar, Zaire e Tanzânia (PAHO/WHO, 2002; WHO, 2000).

Epidemiologia e tipagem em *Yersinia pestis*

A persistência da peste reside na sua complexa epidemiologia. É uma doença de roedores e a transmissão se dá através da picada de pulgas infectadas. O homem contamina-se acidentalmente, ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas. O controle da população animal é extremamente difícil por encontrarem-se, geralmente, em locais inacessíveis, e a completa destruição da população de roedores não garante a extinção dos focos, porque o bacilo da peste pode sobreviver por vários anos nas carcaças dos animais mortos e reinfectar novos ocupantes das tocas. Carnívoros selvagens e domésticos (raposas, cães e gatos), também estão envolvidos no ciclo epidemiológico da peste. Eles se contaminam quando são picados por pulgas infectadas ou ao devorar roedores infectados (Perry & Fetherston, 1997).

No homem a doença pode apresentar-se sob três formas clínicas principais: bubônica, pulmonar e septicêmica. A peste bubônica é a forma mais comum, e caracteriza-se pela presença de um bubão (linfadenite regional) na região próxima à picada da pulga. A peste pneumônica representa uma forma grave da doença que é geralmente fatal, nesta forma pode ocorrer a transmissão homem a homem. Na peste septicêmica, os doentes apresentam manifestações sistêmicas. As três formas da doença respondem bem a antibioticoterapia apropriada reduzindo significativamente a mortalidade. As drogas preconizadas para o tratamento são: estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfazidina (Perry & Fetherston, 1997).

As atividades de vigilância e controle de peste no Brasil, envolvem técnicas bacteriológicas e sorológicas para a pesquisa da *Y. pestis* nos roedores (hospedeiros), pulgas (vetores), e pesquisa de anticorpos em animais sentinela/indicador: roedores, carnívoros domésticos (cães e gatos) e nos pacientes suspeitos de peste (Almeida *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1994; Vieira & Coelho, 1998).

A peste é causada por um bacilo gram-negativo, caracterizado por apresentar um baixo número de reações bioquímicas positivas e uma grande homogeneidade, com um único sorotipo, um fagotipo, e três biovar ou variedades geográficas: Antiqua, Medievalis e Orientalis. Cada variedade foi considerada remanescente da primeira, segunda e terceira pandemias, respectivamente. Esta classificação baseia-se nos resultados das reações de fermentação do glicerol e redução do nitrato a nitrito (Tabela 1). A homogeneidade observada surpreende pelo fato da *Y. pestis* adaptar-se a diferentes tipos de hospedeiros (roedores, homem), diversas espécies de pulgas, bem como diferentes regiões geográficas (Craniet & Mollaret, 1990).

A técnica de ribotipagem é uma ferramenta útil na subdivisão dos isolados de *Y. pestis*. Guiyoule *et al.* (1994) identificaram 16 ribotipos distintos em cepas de *Y. pestis* de cinco continentes, e observaram que existe uma correlação entre os biovar e os ribotipos (Tabela 1). Dentre as cepas estudadas, foram analisadas oito cepas brasileiras, isoladas durante um mesmo surto de peste (Almeida *et al.*, 1985) e observou-se que todas pertenciam ao mesmo ribotipo, o correspondente ao que se supõe ter sido responsável pela última pandemia.

Um novo ribotipo foi observado em cepas do biovar Orientalis isoladas durante o surto de 1994 na Índia (Ramalingaswami, 1995). Posteriormente, Guiyoule *et al.* (1997) detectaram o aparecimento de três novos ribotipos de *Y. pestis*, por ocasião do atual surto de peste em Madagascar, essas cepas foram isoladas em anos diferentes e exibiram perfis plasmidial e genômico específicos, sugerindo que perfis distintos do gene rDNA podem se desenvolver em um curto período de tempo (menos de um século), em uma área geográfica específica.

Com base nos perfis de ribotipagem e sua correlação com as três variedades geográficas, foi postulada a hipótese de que um clone de *Y. pestis* do ribotipo O (Biovar Antiqua) espalhou-se da Ásia Central, Planalto Centro Asiático, para a África Central e causou a Peste de Justiniano. Posteriormente, uma variante do mesmo clone, ribotipo O, que perdeu a capacidade de reduzir o nitrato (Biovar Medievalis) espalhou-se da Ásia Central para a Crimeia e causou a Peste Negra. Considera-se ainda a hipótese de um clone do ribotipo B (Biovar Orientalis), que causou a terceira pandemia, ser derivado do primeiro

clone (ribotipo O), visto que esse clone reduz o nitrato embora tenha perdido a capacidade de fermentar o glicerol. Quanto ao perfil de restrição com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV* os dois clones diferem apenas pela perda de um sítio de restrição no ribotipo B (Guiyoule *et al.*, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **96**:14043-14048.
- Albert, M.J., K. Alam, M. Ansaruzzaman, M.M. Islam, A.S. Rahman, K. Haider, N.A. Bhuiyan, S. Nahar, N. Ryan, and J. Montanaro.** 1992. Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhoea. Infection and Immunity. **60**:5017-5024.
- Albert, M.J., M. Ansaruzzaman, N.A. Bhuiyan, P.K. Neogi, and A.S. Faruque,** 1995. Characteristics of invasion of HEp-2 cells by *Providencia alcalifaciens*. Journal of Medical Microbiology. **42**:186-190.
- Albert M.J., A.S. Faruque, and D. Mahalanabis.** 1998. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. Journal of Clinical Microbiology. **36**:1433-1435.
- Almeida, A.M.P., N.C. Leal, J. Dantas-Sobrinho, F.G. Carvalho, and C.R. Almeida.** 1995. Plague surveillance in Brazil:1983-1992. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **37**: 511-516.
- Almeida, A.M.P., N.C. Leal, T.C.A. Leal, and M. Sobreira.** 2001. Manual de Peste. [Online] <http://www.cpqam.fiocruz.br> (Referência – Vigilância e Controle da peste no Nordeste).
- Araujo M.L.C., I.Y. Ito, M.E.B. Santiago, M.S. Cardoso and E.C. Cunha.** 1986. *Staphylococcus aureus*: Pesquisa de portadores bovinos em lactação e antibiograma das cepas isoladas. Revista de Microbiologia. **17**:350-355.
- Bercovier, H., H.H. Mollaret, J.M. Alonso, J. Brault, G.R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and relationship to *Y. pseudotuberculosis*. Current Microbiology. **4**:225-229.
- Brenner, D.J., J.J. Farmer III, G.R. Fanning, A.G. Steigerwalt, P. Klykken, F.W. Wathen, and W.H. Ewing.** 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness of

Proteus and *Providencia* species. International Journal of Systematic Bacteriology. **28**:269-282.

Carniel, E., and H.H., Mollaret. 1990. Yersiniosis. Comp. Immunity Microbiology Infection Disease. **13**: 51-58.

Carpenter, P. 1964. The *Proteus*-*Providencia* group. Recent advances. Clinical Pathology. **4**:12-23.

Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwel. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Applied and Environmental Microbiology. **65**:2202-2208.

Coetzee, J.N. 1972. Genetics of the *Proteus* group. Annals of Review Microbiology. **26**:23-54.

Cornelis, G.R. 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **97**:8878-8783.

Ewing, W.H. 1986. The tribe *Proteeae*. In Edwards and Ewing's. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed., p.443-459. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Ewing, W.H, B.R. Davis, and J.V. Sikes. 1972. Biochemical characteristics of *Providencia*. Public Health Laboratory. **30**:25-28.

Falkow, S., I.R. Ryman, and O. Washington. 1962. Deoxyribonucleic acid base composition of *Proteus* and *Providencia* organisms. Journal of Bacteriology. **83**:1318-1321.

Guiyoule, A., F. Grimont, I. Iteman, P.A.D. Grimont, M. Lefèvre, and E. Carniel. 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. Journal of Clinical Microbiology. **32**:634-641.

Guiyoule, A., B. Rasoamanana, C. Buchrieser, P. Michel, S. Chanteau, and E. Carniel. 1997. Recent emergence of new variant of *Yersinia pestis* in Madagascar. Journal of Clinical Microbiology. **35**:2826-2833.

Grimont, F. and P.A.D. Grimont. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Annales du Institut Pasteur/Microbiologic. **137B**:165-175.

- Grimont, F. and P.A.D. Grimont.** 1991. La Carte D'Identite moleculaire des bacteries. Bulletin de La Societe Francese Microbiologic. **6**: 9-12.
- Guth, B.E.C. and E. Perrella.** 1996. Prevalence of invasive ability and other virulence-associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in São Paulo, Brazil. Journal of Medical Microbiology. **45**:459-462.
- Guth, B.E.C., K. Irino, and L.R. Trabulsi.** 1999. Clonal structure of *Providencia alcalifaciens* strains isolated from diarrhoeal stools in São Paulo, Brazil. Journal of Medical Microbiology. **48**:205-209.
- Harrison, L.H., and D. Griffin.** 1993. Infectious diseases, p301-339, In P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), Molecular Epidemiology: principles and practices. Academic Press.
- Harvey, J., and A. Gilmour.** 1988. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. Letters in Applied Microbiology. **7**:79-82.
- Haynes, J. and P.M. Hawkey.** 1989. *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. British Medical Journal. **299**:94-95.
- Hust, R., and J.Y. Rao.** 1993. Molecular biology in epidemiology, p 45-78, In P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), Molecular Epidemiology: principles and practices. Academic Press.
- Ibrahim, A., B.M. Goebel, W. Liesack, M. Griffiths, and E. Stackebrandt.** 1993. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S sequences. FEMS Microbiology Letters. **114**:173-178.
- Kapur, V., W.M. Sisco, R.S. Greer, T.S. Whittam, and J.M. Musser.** 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Journal of Clinical Microbiology. **33**:376-380.
- Kauffmann, F., and P.R. Edwards.** 1952. Classification and nomenclature of *Enterobacteriaceae*. International Bulletin of Bacteriology Nomenclature Taxonomic. **2**:2-8.
- Kloos, W.E., and K.H. Sheifer.** 1981. The genus *Staphylococcus*. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Ballows and H.G. Schelegel (ed), p1548-1569. The prokaryotes, Berlin Heidelberg Springer Verlag.

Kluytmans, J., W. Van Leeuwen, W. Goessens, R. Hollis, S. Messer, L. Herwaldt, H. Bruining, M. Heck, A. Van Belkum, and H. Verburgh. 1995. Food-initiated outbreak of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* analysed by pheno and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:1121-1128.

Kostmam, J.R, T.D. Edlind, J.J. Li Puma, and T.L. Stull. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**: 2082-2087.

Lobato, M.J., E. Landeras, M.A. González-Hevia, and M.C. Mendoza. 1998. Genetic heterogeneity of clinical strains *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**:3297-3302.

Magalhães, V., Leal, N.C., Melo, V.M, Sobreira, M. and Magalhães, M. (1996). Invasion of HeLa cells by *Providencia alcalifaciens* presumably is plasmid-encoded. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91:767-768.

Mathan, M.M., Mathan, V.I. and Albert, M.J. (1993). Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Pathology*.171:67-71.

Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. **155**:335-350.

Mollaret, H.H., and E. Thal. 1974. Genus XI. *Yersinia* Van Loghem 1944 p-330-332. In R.E. Buchanan and N.E. Giggons (ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th: Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Mollaret, H.H. 1989. Le cas de la peste. *Ann. Demog. Hist.* 101-110.

Murata T, Iida T, Shiomi Y, Tagomori K, Akeda Y, Yanagihara I, Mushiake S, Ishiguro F, and Honda T. 2001. A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Infectious Diseases*.**184**:1050-1055.

Olive, D.M., and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**:1661-1669.

PAHO/WHO. 2002. Emerging and reemerging diseases. [Online] wysiwyg://conteudo.corpo.mainframe.1/html.glish/HCP/HCT/EER/eer. Acessado em 24 de abril de 2002.

Penner, J.L., P.C. Fleming, G.R. Whiteley, and J.N. Hennessy. 1979a. O-serotyping *Providencia alcalifaciens*. Journal of Clinical Microbiology. **10**:761-765.

Penner, J.L., N.A. Hinton, I.B. Duncan, J.N. Hennessy, and G.R. Whiteley. 1979b. O-serotyping of *Providencia stuartii* isolates collected from twelve hospitals. Journal of Clinical Microbiology. **9**:11-14.

Penner, J.L. 1984. Genus XII. *Providencia* Ewing 1962, p.494-496. In N.R. Krieg and J.G. Holt (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

Pereira, M.S.V., and J.P. Siqueira Júnior 1995. Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle Brazil. Letters in Applied Microbiology. **27**:229-234.

Perry, R., and J.D. Fetherston. 1997. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. Clinical Microbiology Reviews. **10**:35-66.

Picard, B., N. Picard-Pasquier, R. Krishnamoorthy, and P. Goullet. 1991. Correlation between DNA polymorphism and enzyme polymorphism argues in favour of the delineation of two species within *Providencia alcalifaciens*. Research in Microbiology. **142**:965-969.

Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PAD, and Giammanco G. 1999. Molecular characterization of genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. Journal of Clinical Microbiology. **37**:2840-2847.

Raimundo, O. M. Deighton, J. Capstick and N. Gerraty. 1999. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of coagulase gene. Veterinary Microbiology. **66**:275-284.

Ramalingaswani, V. 1995. Plague in India. Nature. **1**:1237-1239.

Rosqvist, R., M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1998. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. Nature. **334**:522-524.

- Rustigian, R. and C.A. Stuart..** 1945. The biochemical and serological relationships of the organisms of *Proteus*. Journal of Bacteriology. **49**:419-436.
- Schulte, P.** 1993. A conceptual and historical framework for molecular epidemiology, p 5-43 In P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), Molecular Epidemiology: principles and practices. Academic Press.
- Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet.** 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at specific position in the *ureD* gene. Infection and Immunity. **69**:170-176.
- Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau, and P. Berche.** 1996. Invasion production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of na IS200-like element within the *inv* gene. Infection and Immunity. **64**:375-379.
- Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervalä.** 2000. Characterization of O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene clusters of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O-1b. Molecular Microbiology. **2**:316-330.
- Skurnik, M., and H. Wolf-Watz.** 1989. Analysis of *yopA* gene encoding the Yop1 virulence of *Yersinia* ssp. Journal of Bacteriology. **3**:517-529.
- Sobreira, M., N.C. Leal, M. Magalhães, B.E.C. Guth, and A.M.P. Almeida.** 2001. Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens*. Journal of Medical Microbiology. **50**:29-34.
- Swaminathan, B., and G.M Matar.** 1993. Molecular typing methods. p 26-50. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White (ed), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, Washington, DC, ASN Press.
- Trebesius, K., D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, and J. Heesemann.** 1998. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. Journal of Clinical Microbiology. **36**:2557-2564.

Vieira, J.B., A.M.P Almeida, and C.R. Almeida. 1994. Epidemiologia e controle da peste no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*. **27**:51-58.

Vieira, J.B. and G.E. Coelho. 1998. Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*. **31**:113-119.

Watts, J.L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. **16**:41-66.

Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont,, O. Kandler, M.L. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr, and H.G. Trupper. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**:463-464.

Welsh, J. and M. MacClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. **18**:7213-7218.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18**:6531-6535.

WHO PAHO. Plague in the Americas. 1965. Scintific Publication. **115**:44-68.

WHO OMS. 2000. Human plague in 1998 and 1999. *Weekly Epidemiology Record*. **75**: 338-343.

Tabela 1. Distribuição das variedades geográficas (biovar) e ribotipos de *Yersinia pestis*.

Biovar	Reações		Distribuição geográfica	Ribotipo
	Glicerol	Nitrato		
Antiqua	+	+	África Central, Norte e Centro da Ásia, China (Manchuria), Mongólia	F a O
Medievalis	+	-	União Soviética (região do Mar Cáspio)	O e P
Orientalis	-	+	China, África do Sul, América do Sul, EUA	A a G, Q, R, S, e T

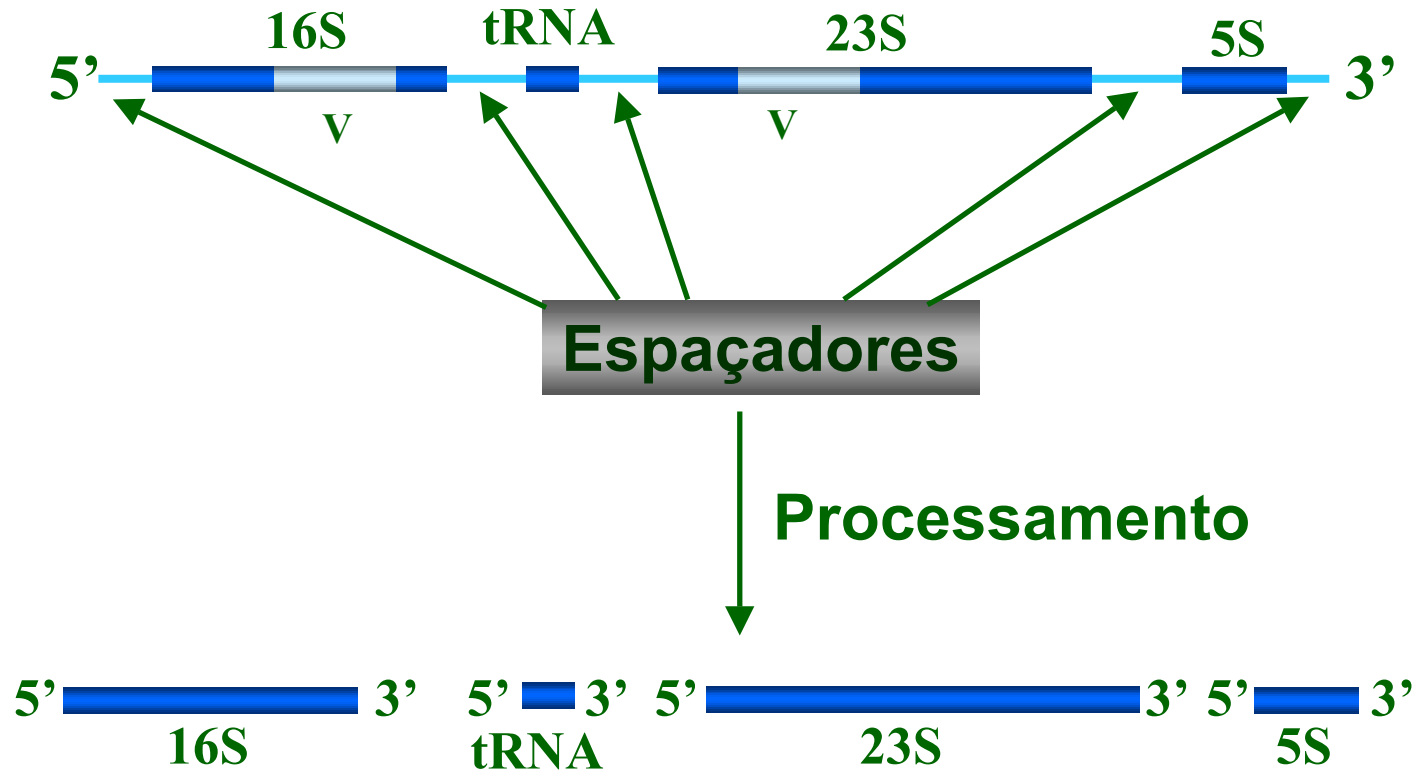


Figura 1. Organização e processamento do operon do rRNA bacteriano.
V - região variável

ARTIGOS

ARTIGO I

Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR

Maria do Socorro Vieira Pereira^{1,3}, Nilma Cintra Leal², Tereza Cristina Arcanjo Leal², **Marise Sobreira²**, Alzira Maria Paiva de Almeida², José Pinto Siqueira-Júnior³, Galba Maria de Campos Takaki⁴

1. Universidade Federal de Pernambuco
2. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ
3. Universidade Federal da Paraíba
4. Universidade Católica de Pernambuco

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*; RAPD-PCR; Ribotyping-PCR.

Aceito para publicação no:
Letters in Applied Microbiology (2002), “in press”
(London)

Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR

M.S.V. Pereira^{1,3}, N.C. Leal², T.C.A. Leal², M. Sobreira², A.M.P. de Almeida², J.P. Siqueira-Júnior³ and G.M. Campos-Takaki⁴

¹Universidade Federal de Pernambuco, ²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife,

³Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, and ⁴Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2001/182: received 15 June 2001 and accepted 6 March 2002

M.S.V. PEREIRA, N.C. LEAL, T.C.A. LEAL, M. SOBREIRA, A.M.P. DE ALMEIDA, J.P. SIQUEIRA-JÚNIOR AND G.M. CAMPOS-TAKAKI. 2002.

Aims: To investigate genetic diversity among *Staphylococcus aureus* and to delineate the geographical distribution of the strains found.

Methods and Results: RAPD-PCR and ribotyping-PCR were employed for the characterization of *Staph. aureus* isolates from bovine and nosocomial origin. Among the strains, five to nine groups were distinguished by RAPD-PCR, depending on which primer was used, while ribotyping-PCR distinguished seven ribotypes.

Conclusions, and Significance and Impact of the Study: These results demonstrate the genetic heterogeneity of the strains studied, and the large dissemination of some clones throughout different regions and hosts, findings that may allow the monitoring of *Staph. aureus* infections.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is one of the most significant pathogens causing hospital-acquired (nosocomial) infections. It is also one of the most frequent agents of bovine mastitis, which has been a substantial economic problem to milk producers worldwide.

Many biochemical and molecular methods have been used in epidemiological investigations of human and bovine staphylococcal infections (Hartstein *et al.* 1989; Prevost *et al.* 1991; Gurtler and Barrie 1995; Kapur *et al.* 1995). Due to their sensitivity and speed of performance, PCR-based typing systems represent useful techniques for the study of *Staph. aureus* of animal and hospital origin and for monitoring their spread. RAPD-PCR is a useful tool for molecular taxonomy studies, especially for phylogenetic analysis among related individuals (Williams *et al.* 1990). Another variation of PCR, which combines PCR and ribotyping, is proving to be very useful for typing clinical isolates. In this technique, polymorphism can be detected

based on variation of the length of bacterial 16S–23S rDNA spacer regions (Kostman *et al.* 1992).

The purpose of this work was to perform molecular typing of bovine and human *Staph. aureus* strains isolated in Brazil, and to investigate their genetic diversity and geographical dispersion to enable the monitoring of *Staph. aureus* infections.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial samples

Six strains (114 U, 122 U, 223 U, 233FN, 311FN and 319 U) of *Staph. aureus* were isolated from apparently healthy lactating cows in farms situated in counties of the semi-arid region of the State of Paraíba, Brazil (Pereira and Siqueira-Júnior 1995). Five human isolates (01H, 10cc, 117H, 184C and 189C) were obtained from the Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Hospital, Brazil (Santos-Filho *et al.* 1994).

DNA preparation

Genomic DNA from the 11 *Staph. aureus* strains was extracted according to Sambrook *et al.* (1989), except that the cells were incubated at 60°C for 20 min with 10 µg

Correspondence to: Dr M.S.V. Pereira, DBM/CCEN, Universidade Federal da Paraíba, 58059–900 João Pessoa (PB), Brazil (e-mail: svieira@dbm.ufpb.br).

lyso-staphin and 50 µg proteinase K to lyse the cell walls. The DNA obtained was quantified after electrophoresis in 1% agarose gels, using a known amount of *Hind* III-digested bacteriophage λ DNA.

RAPD-PCR typing

Preliminary assays were performed with *Staph. aureus* strain 319 U and 16, 10-base pair (bp) primers drawn for different purposes, to select the primers that generated clear and reproducible bands.

The amplifications were carried out, under low-stringency conditions, using a thermocycler (Perkin Elmer) programmed for 30 cycles comprising one step of denaturation for 1 min at 94°C, one step of annealing for 1 min at 36°C and one step of extension for 2 min at 72°C, followed by a final step of extension for 7 min at 72°C.

The reactions were prepared in a final volume of 25 µl containing: 20 ng DNA template, 1 unit *Taq* DNA polymerase (Pharmacia), 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl pH 9.0, 3 mmol l⁻¹ MgCl₂, 50 mmol l⁻¹ KCl, 200 µmol l⁻¹ of each dNTP and 20 pmol l⁻¹ of primer. Amplification products were subjected to electrophoresis in 1.5% agarose gels, Tris-borate buffer and a constant voltage of 100 V. The molecular weight standard used to determine the sizes of the amplified fragments was the 100 bp DNA marker. After staining with ethidium bromide and visualization in a u.v. transilluminator, the gels were photographed. A negative control was included in each PCR run with no target DNA. The reproducibility of the amplification results was evaluated by repeating the PCR reactions at least three times on different days.

The clearest and most reproducible bands were chosen for determination of their presence or absence in each strain. Faint bands which could not be systematically visualized were not taken into account.

Ribotyping-PCR

One pair of primers, 5'-TTGTACACACCGCCCGTCA-3' and 5'-GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC-3', which were described by Kostman *et al.* (1992), was used in this study. The reactions were prepared in a total volume of 25 µl containing: 20 ng DNA, 1 unit *Taq* DNA polymerase (Pharmacia), 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl pH 9.0, 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 200 µmol l⁻¹ of each dNTP and 20 pmol l⁻¹ of each primer. The DNA was amplified during 30 cycles of PCR comprising one step of denaturation for 1 min at 94°C, one step of annealing for 1 min at 55°C, one step of extension at 72°C for 1 min, followed by a final step of extension for 4 min at 72°C. A negative control without DNA was included. Samples (10 µl) of the PCR products were

analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and visualized as previously described.

RESULTS

RAPD-PCR typing

Sixteen primers were tested for their ability to yield the best DNA banding (RAPD-PCR) pattern. Primers 786: 5'-GCG

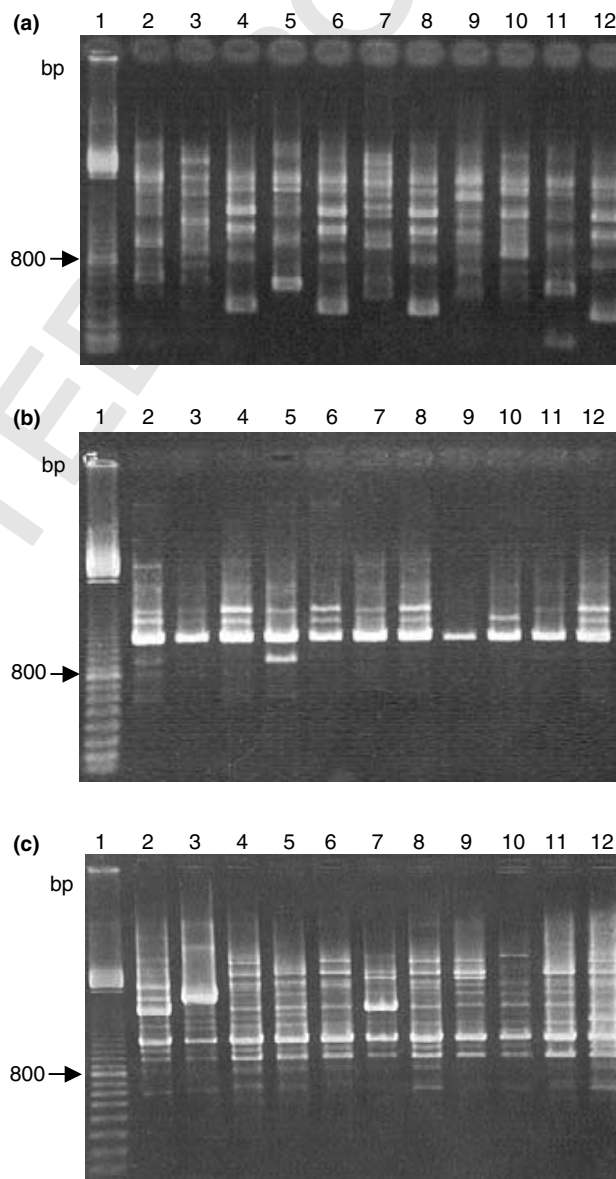


Fig. 1 RAPD-PCR profiles of amplification from *Staphylococcus aureus* strains. Lane 1: 100 bp ladder DNA marker; lane 2: 01H; lane 3: 10cc; lane 4: 117H; lane 5: 184C; lane 6: 189C; lane 7: 114 U; lane 8: 122 U; lane 9: 223 U; lane 10: 233FN; lane 11: 311FN; lane 12: 319 U. (a) Amplification with primer 786; (b) amplification with primer 797; (c) amplification with primer 798

ATCCCCA-3'; 797: 5'-AGCGTCACTG-3' and 798: 5'-TGACCCGCC-3' were found to be the most appropriate. They produced the clearest and most reproducible bands with *Staph. aureus* strain 319 U DNA, and were chosen for the RAPD-PCR assays to analyse the animal and clinical isolates. The patterns generated by repetition of the reactions on different days were similar.

Amplification of the 11 *Staph. aureus* strains by RAPD-PCR with the chosen primers resulted in a polymorphic pattern composed of several bands. A total of 22 different RAPD-PCR patterns was produced with the three primers used. Amplification with primer 786 resulted in three to six clear bands in the range 400 to > 2000 bp (Fig. 1a); primer 797 generated one to three bands ranging from 1000 to 1800 bp (Fig. 1b), and primer 798 produced five to nine bands from 1000 to > 2000 bp in all *Staph. aureus* strains (Fig. 1c).

By combining the different amplification patterns observed, the 11 *Staph. aureus* strains analysed could be classified into nine different RAPD-PCR groups termed in this work G1–G9. Table 1 shows the distribution of the 11 strains among the different groups.

Strains 117H, 122 U and 189C exhibited the same profile, characterized by amplification of the same number of bands specific for each of the three primers (G1). Strain 319 U showed a profile identical to the ones observed with these strains with two primers, but a different pattern with primer 798 (G2). Strains 114 U, 10cc and 01H generated a pattern similar to those strains with primer 797, but different profiles with primers 798 and 786 (G3–G5). Strains 184C, 223 U 233FN and 311FN generated different patterns with each primer (G6–G9).

Although some of the strains analysed harboured plasmids, the primers used were unable to distinguish between plasmid-bearing and non-plasmid-bearing strains.

Ribotyping-PCR

The amplification patterns obtained by this procedure were stable and reproducible. Five to eight bands in the range of approximately 650–1100 bp were generated. Figure 2 shows an agarose gel with the ribotype-PCR patterns found in the 11 *Staph. aureus* strains.

Based on their respective amplification patterns, the 11 *Staph. aureus* strains could be classified into seven ribotypes designated R1–R7. Table 2 shows the distribution of the 11 strains among the different ribotypes. R3 clustered the highest number of strains (117H, 319 U and 189C),

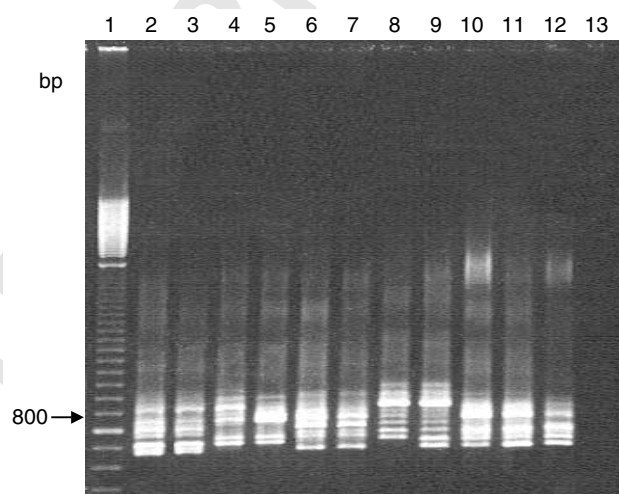


Fig. 2 Ribotype patterns of the 11 *Staphylococcus aureus* strains obtained by ribotyping-PCR. Lane 1: 100 bp ladder DNA marker; lane 2: 01H; lane 3: 114 U; lane 4: 10cc; lane 5: 122 U; lane 6: 184C; lane 7: 311FN; lane 8: 223 U; lane 9: 233FN; lane 10: 117H; lane 11: 319 U; lane 12: 189C; lane 13: negative control

Table 1 Distribution of the *Staphylococcus aureus* strains according to the RAPD-PCR patterns obtained with the three primers

RAPD-PCR Groups	Primer 798	Primer 786	Primer 797
G1	117H, 122U, 189C	117H, 122U, 189C, 319U*	117H, 122U, 189C, 319U*, 114U†, 10cc†, 01H†
G2	319U*	*	*
G3	114U†	114U†	†
G4	10cc†	10cc†	†
G5	01H†	01H†	†
G6	184C	184C	184C
G7	223U	223U	223U
G8	233FN	233FN	233FN
G9	311FN	311FN	311FN

In bold, strains exhibiting the same pattern with the three primers.

*Strain exhibiting the G1 pattern with two primers.

†Strains exhibiting the G1 pattern with one primer.

Table 2 Distribution of the *Staphylococcus aureus* strains according to the ribotyping-PCR amplification patterns

Ribotypes (R)	<i>Staphylococcus aureus</i> strains
R1	01H; 114U
R2	184C; 311FN
R3	117H; 319U; 189C
R4	10cc
R5	122U
R6	223U
R7	233FN

followed by R1 and R2 harbouring two strains each; R4–R7 contained only one strain each.

DISCUSSION

A number of procedures for the comparison of bacterial isolates are proving to be important in investigations of strain origin, clonal relatedness among strains and epidemiology (Van Belkum *et al.* 1995; Olive and Bean 1999; Van der Zee *et al.* 1999). Molecular methods are now recognized as more effective than the traditional methods of phenotyping for typing different organisms.

In view of the considerable genetic heterogeneity in natural populations of *Staph. aureus*, appropriate systems of typing are needed to determine the genetic structure of the isolates, enabling a rational and effective strategy for epidemiological control.

Molecular typing is essential for the characterization and differentiation of *Staph. aureus* strains of human and animal origin because they have different phenotypic characteristics. Pereira and Siqueira-Júnior (1995) showed that *Staph. aureus* strains isolated from animals exhibit antibiotic resistance patterns very different from those of human origin. Furthermore, the frequency of resistance is low among the bovine strains, while nosocomial strains exhibit a high frequency of resistance.

Thus, in this work, the RAPD-PCR and ribotyping-PCR techniques were used to investigate genetic polymorphism among 11 *Staph. aureus* strains of bovine and human origin.

RAPD-PCR detected genetic heterogeneity among the human and bovine *Staph. aureus* strains. The 11 strains analysed were classified into five to nine groups, according to the primer employed. Two strains of human origin and one isolate of bovine origin shared the same amplification profile specific for each one of the three primers (117H, 189C and 122 U).

Traditional ribotyping has been used for the detection of polymorphism in several micro-organisms and is a valuable tool for taxonomy and the identification of complex species (Laurent *et al.* 1996). However, technical difficulties, such

as the length of time required and the use of radioisotopes, has limited its application.

Gürtler and Barrie (1995) used ribotyping-PCR to detect polymorphism within *Staph. aureus* isolates. Polymorphism was also observed in the present study and seven ribotypes could be identified among the 11 strains studied. It is interesting to note that three ribotypes included strains of human and animal origin. The strains were of different origin, which may suggest that certain clones of *Staph. aureus* spread quickly.

The results confirmed the usefulness of RAPD-PCR and ribotyping-PCR for typing *Staph. aureus*. Both techniques can be used for detection of polymorphism in *Staph. aureus*. Ribotyping-PCR detected seven ribotypes and nine groups were detected by RAPD-PCR. The ribotyping-PCR technique has the advantage that it is less prone to variation because it is specific and is performed under high-stringency conditions. Therefore, these techniques constitute valuable tools for tracing the sources of *Staph. aureus* infections of either human or animal origin, and they will be very useful for molecular epidemiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Mrs Yara M.M. Nakasawa and Mrs Silvana Santos (CPqAM/FIOCRUZ, Brazil) for their technical assistance. They thank Dr Krystyna Goralch Lira (UFPPB, Brazil) for critical review of the manuscript. They thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq and Pronex for financial support.

REFERENCES

- Gürtler, V. and Barrie, H.D. (1995) Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S–23S rDNA spacer sequences. *Microbiology* **141**, 1255–1265.
- Hartstein, A.I., Morthland, V.H., Eng, S. *et al.* (1989) Restriction enzyme analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *Staphylococcus aureus* blood culture isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 1874–1879.
- Kapur, V., Sisco, W.M., Green, R.S. *et al.* (1995) Molecular population genetic analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 376–380.
- Kostman, J.R., Edling, T.D., Lipuma, J.J. and Stull, T.L. (1992) Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2084–2087.
- Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J. and Freney, J. (1996) Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1079–1082.
- Olive, D.M. and Bean, P. (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1661–1669.

- Pereira, M.S.V. and Siqueira-Júnior, J.P. (1995) Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Letters in Applied Microbiology* **20**, 391–395.
- Prevost, G., Pottecher, B., Dahlet, M. *et al.* (1991) Pulsed-field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infections* **17**, 255–269.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Filho, L., Freitas, F.I.S. and Siqueira-Júnior, J.P. (1994) Evolution of drug-resistance in *Staphylococcus aureus* from a Brazilian University Hospital. *Folha Médica (Rio de Janeiro)* **108**, 101–103.
- Van Belkum, A., Kluytmans, J., Van Leeuwen, W. *et al.* (1995) Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1537–1547.
- Van der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon, J.C. *et al.* (1999) Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 342–349.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. *et al.* (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531–6535.

ARTIGO II

Ribotipagem-PCR de isolados clínicos de *Providencia alcalifaciens*

Marise Sobreira^{1,2}, Nilma Cintra Leal¹, Cláudia Juliana T. L. Crasto¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹

1. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/MS, Recife- PE Brasil
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE Brasil

Palavras chave: *Providencia alcalifaciens*; ribotipagem; PCR.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Journal of Medical Microbiology (London)

RIBOTIPAGEM-PCR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Providencia alcalifaciens*

M. Sobreira, N.C. Leal, C.J.T.L. Castro, A.M.P. Almeida.

Resumo

Providencia alcalifaciens vem sendo apontada, há vários anos, como um dos agentes causadores da diarreia desde que algumas vezes é encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarreicas de pacientes na ausência de outros patógenos intestinais, mas apenas recentemente o seu papel como agente causador de gastroenterite foi demonstrado. Esta espécie tem se mostrado muito heterogênea quanto ao perfil plasmidial, padrões de amplificação por RAPD-PCR e polimorfismo de restrição do rDNA. Para avaliar a diversidade genética de isolados de *P. alcalifaciens* da cidade do Recife, 72 amostras obtidas de casos humanos de gastroenterite foram analisadas por Ribotipagem-PCR utilizando “primers” descritos para seqüências conservadas das regiões 16S e 23S dos genes do rRNA, para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas. Os resultados demonstraram grande polimorfismo genético entre as amostras estudadas que estão distribuídas em numerosos ribotipos. Esses dados apontam a eficácia da técnica como ferramenta epidemiológica para *P. alcalifaciens*.

Introdução

Providencia alcalifaciens vem sendo considerada como um dos agentes causadores de diarreia, desde que algumas vezes é encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarreicas de pacientes, principalmente crianças, na ausência de outros patógenos intestinais [1 - 4]. No entanto, foi descrita como uma bactéria comensal do trato gastrointestinal que exarceba durante infecções causadas por vírus ou outros agentes bacterianos, sendo por muito tempo questionado o seu papel na doença diarreica [5].

Sua importância clínica aumentou após ter sido apontada como agente da “diarreia dos viajantes britânicos” [6]. Recentemente, por ocasião de um grande surto de infecção alimentar ocorrido entre crianças e professores de escolas da cidade de Fukui-Japão por *P. alcalifaciens*, seu papel como agente causador da gastroenterite foi novamente evidenciado [7].

A transmissão se dá por via oral, pela ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes. Os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade em *P. alcalifaciens* ainda são pouco conhecidos, supõe-se que a habilidade invasiva em células evidenciada *in vivo* e *in vitro* esteja envolvida no mecanismo de virulência dessa bactéria [8 -10, 4, 7]. Entretanto esta característica não é exibida por todos os isolados de origem diarreica [11], sendo demonstrada também por isolados de origem não diarreica [3].

P. alcalifaciens é uma espécie fenotipicamente muito heterogênea apresentando dois biogrupos, dois zimotipos, vários sorogrupos e diversos bacteriocinotipos [5, 12, 13]. Esta heterogeneidade é reforçada pela ocorrência de perfis plasmidiais variados, além do polimorfismo no padrão de RAPD-PCR e polimorfismo de restrição do rDNA [12, 14, 15].

Diante da considerável heterogeneidade descrita em *P. alcalifaciens*, sistemas de tipagem são necessários para a determinação da estrutura genética e monitoramento epidemiológico deste agente. A grande variabilidade de

padrões de restrição do rDNA demonstrada nas espécies do grupo *Proteus-Providencia* e em particular em *P. alcalifaciens* sugere a ribotipagem como um método muito sensível para investigações epidemiológicas aplicadas ao estudo de infecções causadas por esse agente [15].

A ribotipagem tem sido proposta como uma ferramenta importante para análises taxonômicas e epidemiológicas em bactérias [16]. Esta técnica tem sua aplicação limitada por ser trabalhosa envolvendo clivagem do DNA, “Southern blotting” e hibridização com sonda. Uma outra técnica que envolve a PCR baseia-se na amplificação dos genes ribossomais, que codificam o rRNA 16S ou 23S e é muito utilizada para identificações ao nível de espécie [17, 18] mas, não se presta para subtipagens. A utilização de “primers” que amplificam a região espaçadora intergênica (ISR), em especial a que está localizada entre os genes que codificam os rRNA 16S e 23S, gera perfis de amplificação que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos [19, 20].

O objetivo deste trabalho foi analisar isolados de *P. alcalifaciens* obtidos na cidade do Recife, através da técnica de Ribotipagem-PCR para avaliar a diversidade genética entre as amostras.

Materiais e métodos

Bactérias e condições de cultivo

Um total de 72 amostras de *P. alcalifaciens* isoladas de fezes diarréicas de casos humanos de gastroenterite foram analisadas. As culturas foram obtidas de um laboratório privado da cidade do Recife, Brasil durante o período de 1994 a 1997, e conservadas na Bacterioteca do CPqAM. Para este trabalho foram renovadas por repique em caldo infuso de cérebro e coração (Brain Heart Infusion broth, Difco: BHI) por 18 horas, incubadas a 37°C e plaqueadas em gelose peptonada (Blood Agar Base, Difco: BAB).

Extração do DNA genômico

O DNA genômico das culturas foi extraído segundo protocolo baseado em Maniatis *et al.* [21] e quantificado após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando para comparação uma quantidade conhecida do DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III.

Amplificação das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S-23S

Foi utilizado um par de “primers” desenhado por Chun *et al.* [20] para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S e 23S: 5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3' e 5'-ACGAATTCTGACTGCCMRGGCATCA-3'.

As reações foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA genômico, 40 pmol de cada “primer”, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,16mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-Pharmacia), 1,5mM de MgCl₂, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Biometra) programado para uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 30 ciclos correspondendo cada ciclo a uma etapa de desnaturação do DNA por 1 minuto a 94°C, seguida do anelamento de 1 minuto a 50°C e alongamento de 1,5

minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato e voltagem constante de 100V, corados com brometo de etídio (15mg/ml) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado o “100 base-pair DNA ladder” (Amersham Pharmacia Biotec).

Ribotipagem diretamente das culturas em caldo

Neste ensaio uma alíquota de 200µl de cada cultura em caldo foi centrifugada e o sedimento ressuspenso em 20µl de água deionizada estéril, fervido em banho-maria por 10 minutos, para lisar as células e expor o material genético, e utilizados 10µl dos lisados diretamente nas reações de PCR.

Avaliação da estabilidade dos padrões de ribotipagem em colônias suspensas em água

A partir da cultura de duas amostras (Pa. 01 e Pa. 02) crescidas em placas de BAB, foram realizadas reações de amplificação utilizando 2, 4, 6 e 10 unidades formadoras de colônias (UFC) suspensas em 20µl de água deionizada estéril. As suspensões foram fervidas por 10 minutos em banho-maria e 10µl dos lisados aplicados diretamente nas reações de PCR.

Resultados e discussão

O polimorfismo do padrão de restrição do rDNA tem sido usado para tipagem de várias espécies de bactérias patogênicas, mas seu poder discriminatório varia de espécie para espécie. Em *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica* é altamente discriminatória [22, 23], mas não tem capacidade discriminatória em *Salmonella* [24]. Em *P. alcalifaciens* é indicado como um método sensível para investigações epidemiológicas [15].

Neste estudo, um total de 72 amostras de *P. alcalifaciens* foram analisadas através da técnica de Ribotipagem-PCR utilizando um par de “primers” desenhados para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S do rRNA [20].

Inicialmente foi realizada a ribotipagem com o DNA genômico extraído de seis amostras. Os padrões de amplificação revelaram-se muito polimórficos, quanto ao tamanho e ao número de segmentos (bandas) amplificados. Observou-se a amplificação de três a sete bandas de tamanho variando entre 500 a 1600 pb (Figura 1). Os diferentes perfis permitiram a distribuição das culturas em cinco ribotipos (Tabela 1).

A ribotipagem por PCR, apesar de mais simples e de mais fácil execução que a ribotipagem que emprega o perfil de restrição, ainda é uma técnica trabalhosa quando é realizada a partir do DNA extraído das culturas. Alguns trabalhos mostram que a amplificação diretamente de culturas crescidas em caldo, e em colônias crescidas nas placas e suspensas em água é factível [25, 26].

Visando simplificar a técnica e diminuir seu custo para analisar maior número de amostras, foi realizado um ensaio para verificar a possibilidade de realizar as reações diretamente das culturas crescidas em caldo em seis amostras. Não houve amplificação em nenhuma das amostras, possivelmente pela ação impediante exercida pelo meio de cultura, visto que a PCR pode ser inibida por constituintes do meio de cultura ou por componentes presentes no material biológico [27].

Em contrapartida, nos ensaios realizados diretamente das colônias crescidas em placas houve amplificação a partir dos diferentes números de colônias (2, 4, 6 e 10 colônias) de uma mesma cultura, nas duas amostras (Pa. 1 e Pa. 2) e os padrões de amplificação foram similares (Figura 2). O padrão de amplificação obtido na reação com quatro colônias foi considerado o mais satisfatório por apresentar maior nitidez e clareza dos fragmentos amplificados favorecendo a análise das bandas amplificadas. Foi observado que a PCR se torna mais específica em presença de concentrações adequadas do DNA molde, enquanto que, a presença de elevadas concentrações de DNA tende a diminuir a especificidade da reação.

Com esses resultados foram usadas quatro colônias de cada cultura para ribotipagem das 72 amostras. Nas amplificações obtidas diretamente das colônias, observou-se amplificação de uma a sete bandas de tamanho variando entre 450 a 1800 pb. Com base nos seus respectivos padrões de amplificação, as 72 amostras foram classificadas em 34 ribotipos. A Tabela 1 mostra a distribuição das amostras em cada ribotipo e a Figura 3 (a, b) mostra um gel de agarose representativo dos 34 ribotipos.

Estes resultados confirmam a grande heterogeneidade genética de *P. alcalifaciens*, demonstrada anteriormente em outros estudos que descrevem perfis plasmidiais muito heterogêneos, desde cepas sem plasmídeos a cepas com cinco plasmídeos, um polimorfismo no padrão de RAPD-PCR [11] e uma heterogeneidade de ribotipos através da análise combinada de padrões de ribotipagem obtidos com diferentes enzimas de restrição [14, 15].

Em contraste com esta heterogeneidade, foi observada grande homogeneidade através de PFGE em culturas isoladas de um surto de infecção alimentar no Japão [7]. Esta diferença deve-se ao fato que as culturas analisadas no presente estudo e por outros autores terem sido isoladas de casos esporádicos de gastroenterite. Por outro lado, a análise genética dos isoladas de casos esporádicos revela uma relação clonal entre as culturas que apresentam capacidade invasiva indicando a existência de clones específicos responsáveis

pela propriedade invasiva que são distribuídos endemicamente nas populações estudadas [11, 14].

Em conclusão, as 72 amostras analisadas neste trabalho apresentaram grande diversidade genética com padrões de amplificação muito polimórficos. A ribotipagem por PCR demonstrou uma grande capacidade discriminatória em *P. alcalifaciens* e simplicidade na execução, podendo ser realizada diretamente de colônias crescidas em placas de BAB. Esses dados apontam a eficácia da técnica como ferramenta epidemiológica para *P. alcalifaciens*.

Referências

1. Sen R. Isolation of strains of *Providencia* group from cases with diarrhoea in Ibadan, Nigeria, West Africa. *Indian J Med Res* 1962; **50**:622-626.
2. Albert MJ, Faruque AS, D. Mahalanabis. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:1433-1435.
3. Guth BEC, Perrella E. Prevalence of invasive ability and other virulence-associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol* 1996; **45**:459-462.
4. Magalhães V, Leal NC, Melo VM, Sobreira M, Magalhães M. Invasion of HeLa cells by *Providencia alcalifaciens* presumably is plasmid-encoded. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**:767-768.
5. Penner JL. Genus XII. *Providencia* Ewing 1962. In N.R. Krieg & J.G. Holt (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Baltimore.1984: 494-496.
6. Haynes J, Hawkey PM. *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. *Br Med J* 1989; **299**:94-95.
7. Murata T, Iida T, Shiomi Y, Tagomori K, Akeda Y, Yanagihara I, Mushiake S, Ishiguro F, Honda T. A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Infectious Diseases*.2001;**184**:1050-1055.
8. Albert MJ, Alam K, Ansaruzzaman M. *et al.* Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhoea. *Infect Immun* 1992; **60**:5017-5024.
9. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Neogi PK, Faruque AS. Characteristics of invasion of HEp-2 cells by *Providencia alcalifaciens*. *J Med Microbiol* 1995; **42**:186-190.
10. Mathan MM, Mathan VI, Albert MJ. Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens* *J Pathol* 1993; **171**:67-71.
11. Sobreira M, Leal NC, Magalhães M, Guth BEC, Almeida AMP. Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens*. *J Med Microbiol* 2001;**50**:29-34.
12. Ewing WH, Davis BR, Sikes JV. Biochemical characteristics of *Providencia*. *Public Health Lab* 1972; **30**:25-28.

13. Picard B, Picard-Pasquier N, Krishnamoorthy R, Goullet P. Correlation between DNA polymorphism and enzyme polymorphism argues in favour of the delineation of two species within *Providencia alcalifaciens*. *Res Microbiol* 1991; **142**:965-969.
14. Guth BEC, Irino K, Trabulsi LR. Clonal structure of *Providencia alcalifaciens* strains isolated from diarrhoeal stools in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol* 1999; **48**:205-209.
15. Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PAD, Giammanco G. Molecular characterization of genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:2840-2847.
16. Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1998; **137B**:165-175.
17. Ibraim A, Goebel BM, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1993; **114**:173-178.
18. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA- targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:2557-2564.
19. Kostman JR, Edlind, TD, LiPuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:2082-2087.
20. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**:2202-2208.
21. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982: 368-369.
22. Chetoui H, Delhalle E, Osterrieth P, Rousseaux D. Ribotyping for use in study molecular epidemiology of *Serratia marcescens*: comparison with biotyping. *J Clin Microbiol*. 1995; **33**:2637-2642.
23. Itman I, Guiyoule A, Carniel E. Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J Med Microbiol* 1996; **45**:48-56.

24. Liebisch B, Schwarz S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *J Med Microbiol* 1996; **44**:52-59.
25. Graf J. Diverse restriction fragment length polymorphisms patterns of PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. . *J Clin Microbiol* 1999; **37**:3194-3197.
26. Gruner E, Felpp M, Gabathuler U, Thong KL, Altwegg M. Outbreak of typhoid fever in a non-endemic area: comparison of molecular typing methods. *J Microbiol Methods* 1997; **28**:179-185.
27. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples microbial diagnostic assays and DNA-extractions solutions. *Int J Food Microbiol* 1992; **17**:27-45.

Tabela 1. Distribuição das amostras de *Providencia alcalifaciens* nos diferentes ribotipos.

Ribotipos (R)	<i>Providencia alcalifaciens</i>
R1	Pa. 01*, Pa. 02*
R2	Pa. 03*, Pa. 07, Pa. 08
R3	Pa. 05*, Pa. 09
R4	Pa. 04*
R5	Pa. 06*
R6	Pa.10
R7	Pa. 11
R8	Pa. 12
R9	Pa.13, Pa.14, Pa. 15
R10	Pa. 16
R11	Pa. 17, Pa. 18, Pa. 19, Pa. 20, Pa. 21, Pa. 22, Pa. 41
R12	Pa.23, Pa. 24, Pa.25
R13	Pa. 26
R14	Pa. 28, Pa. 29, Pa.30
R15	Pa. 31, Pa.32, Pa.33, Pa. 34, Pa.35
R16	Pa. 36
R17	Pa. 37
R18	Pa. 38
R19	Pa. 39
R20	Pa. 40
R21	Pa. 42, Pa. 48, Pa. 52
R22	Pa. 44
R23	Pa. 45, Pa.47
R24	Pa. 46
R25	Pa. 49, Pa.50, Pa. 51, Pa. 53
R26	Pa. 55, Pa. 56, Pa.58, Pa. 59
R27	Pa. 57
R28	Pa. 60
R29	Pa. 61
R30	Pa. 62, Pa.68, Pa. 71, Pa. 72, Pa. 75
R31	Pa. 63, Pa.64
R32	Pa. 65, Pa.67, Pa. 69 e Pa. 74
R33	Pa. 66
R34	Pa. 70, Pa.73

*- Amostras analisadas a partir do DNA extraído e diretamente das colônias crescidas em placas.

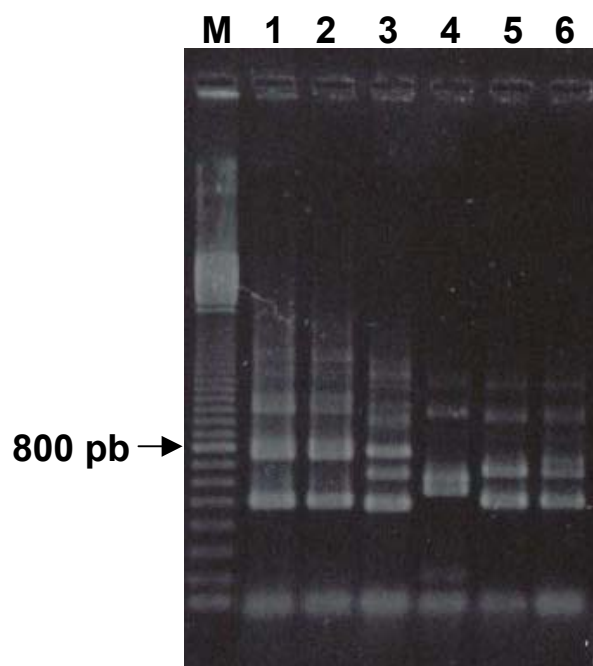


Figura 1. Gel de agarose 1,5% das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR a partir do DNA extraído das amostras de *Providencia alcalifaciens*. Linhas, **M**: DNA-ladder 100 pb; **1**: Pa. 01; **2**: Pa. 02; **3**: Pa. 03; **4**: Pa. 04; **5**: Pa. 05; **6**: Pa. 06.

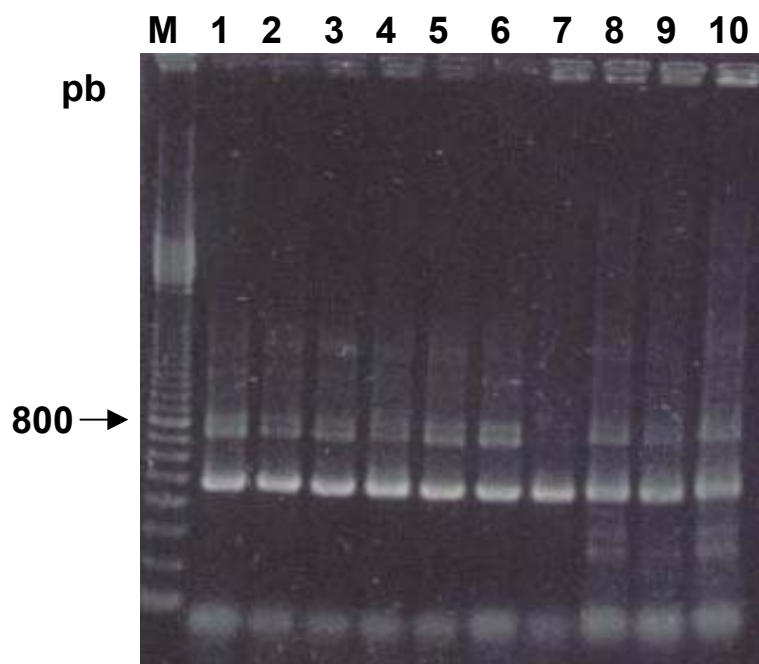


Figura 2. Gel de agarose 1,5% das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR a partir do lisado de colônias retiradas do meio sólido e suspensas em água das amostras de *Providencia alcalifaciens*. Linhas, **M:** “100pb DNA Ladder”; **1:** Pa. 01 (DNA); **2:** Pa. 01 (2 col.); **3:** Pa. 01 (4 col.); **4:** Pa. 01 (6 col.); **5:** Pa. 01 (10 col.); **6:** Pa. 02 (DNA); **7:** Pa. 02 (2 col.); **8:** Pa. 02 (4 col.); **9:** Pa. 02 (6 col.); **10:** Pa. 02 (10 col.).

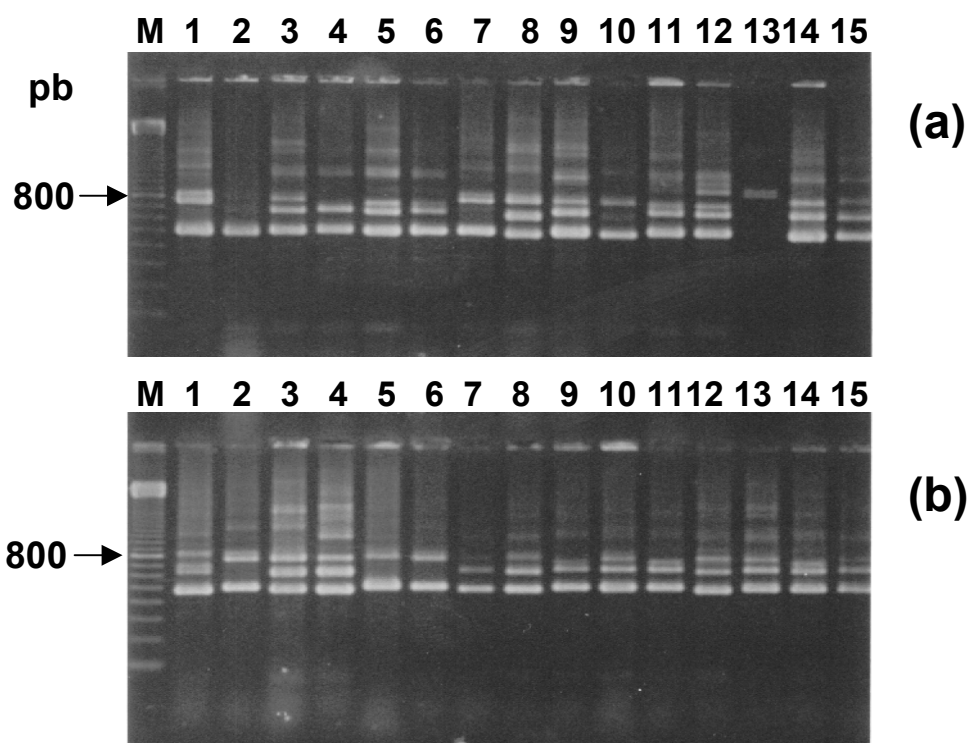


Figura 3. (a, b). Géis de agarose 1,5% representativo das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR de cepas de *Providencia alcalifaciens*. Linha, **M**: “100pb DNA Ladder”; **(a)**- Linhas, **1**: Pa. 01; **2**: Pa. 03; **3**: Pa. 04; **4**: Pa. 05; **5**: Pa. 06; **6**: Pa. 10; **7**: Pa. 11; **8**: Pa. 12; **9**: Pa. 13; **10**: Pa. 16; **11**: Pa. 17; **12**: Pa. 18; **13**: Pa. 19; **14**: Pa. 20; **15**: Pa. 21. **(b)**- Linhas, **1**: Pa. 22; **2**: Pa. 23; **3**: Pa. 24; **4**: Pa. 26; **5**: Pa. 28; **6**: Pa. 29; **7**: Pa. 33; **8**: Pa. 34; **9**: Pa. 35; **10**: Pa. 36; **11**: Pa. 37; **12**: Pa. 38; **13**: Pa. 39; **14**: Pa. 40; **15**: Pa. 41.

ARTIGO III

Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em amostras de yersínias patogênicas

Marise Sobreira^{1,2}, Nilma Cintra Leal¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹

1. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/MS, Recife- PE Brasil
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE Brasil

Palavras chave: *Yersinia*; rRNA; tRNA; ribotipagem-PCR.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Journal of Clinical Microbiology (Washington, DC)

ANÁLISE DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNICA DO rRNA 16S-23S EM AMOSTRAS DE YERSÍNIAS PATOGÊNICAS

M. Sobreira, N.C. Leal, A.M.P. Almeida.

Resumo

O gênero *Yersinia* contém três espécies patogênicas para animais e humanos: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. As duas primeiras são altamente relacionadas, sob o aspecto genético, sendo consideradas uma única espécie genômica, enquanto que *Y. enterocolitica* é mais divergente. “Primers” descritos para seqüências conservadas das regiões do terminal 3’ do rDNA 16S e 5’ do rDNA 23S foram utilizados para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas dessas espécies. As culturas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* analisadas exibiram o mesmo perfil de amplificação. Os “amplicons” obtidos foram analisados através das técnicas de sequenciamento e perfil de restrição. As seqüências de nucleotídeos dos “amplicons” das duas espécies, demonstraram um elevado índice de similaridade exibindo os mesmos tipos e números de tRNAs; a clivagem dos “amplicons” com a enzima *Alu* I, demonstrou um polimorfismo entre elas, indicando que apesar da similaridade observada quanto ao número e tipos de tRNAs, codificados estas duas espécies apresentam variação nas regiões espaçadoras do rRNA 16S-23S. Por outro lado, as amostras de *Y. enterocolitica* analisadas mostraram quatro perfis de ribotipagem distintos, evidenciando um polimorfismo genético. Estes dados reforçam a identidade genética observada entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* e a relacionam à evolução de *Y. pestis*, que supõe-se ser, um clone derivado de *Y. pseudotuberculosis*.

Introdução

O gênero *Yersinia*, membro da família Enterobacteriaceae, contém 11 espécies, das quais três são patógenos humanos: *Y. pestis*, agente causador da peste bubônica; *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que são enteropatógenos. A patogenicidade nestas três espécies é mediada por um plasmídeo comum o pYV (~70 kb) (6). Além deste as cepas típicas de *Y. pestis* abrigam mais dois plasmídeos de virulência: o pFra (100 kb) e o pPst (9,5 kb) (22).

A peste é uma doença primariamente de roedores e a transmissão se dá através da picada de pulgas infectadas. O homem contamina-se acidentalmente, ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas. Três grandes pandemias bem caracterizadas foram registradas durante a era Cristã. A primeira pandemia, denominada "Peste de Justiniano" (542-602 d.C) teve início na África Central se estendeu para o Egito e estima-se que chegou a matar 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia ou Peste Negra, iniciou na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia. A terceira pandemia ou pandemia Contemporânea, teve início na China estendendo-se para Hong Kong em 1894 e de lá se espalhou para todos os continentes, através do transporte marítimo (22).

No Brasil, a peste chegou em 1899, inicialmente infectou várias cidades litorâneas, de onde foi eliminada através de medidas sanitárias adequadas e focalizou-se entre os roedores silvestres, na área rural, principalmente na região Nordeste permanecendo até o presente (27, 28).

Y. pestis, caracteriza-se por apresentar um baixo número de reações bioquímicas positivas e uma grande homogeneidade, com um único sorotipo, um fagotipo, e três biovar ou variedades geográficas: Antiqua, Medievalis e Orientalis, que se distinguem pela capacidade de fermentar o glicerol e de reduzir o nitrato a nitrito; cada variedade foi considerada remanescente da primeira, segunda e terceira pandemias, respectivamente (4). A homogeneidade observada na *Y. pestis* surpreende pelo fato desta bactéria

adaptar-se a diferentes tipos de hospedeiros (roedores, homem), diversas espécies de pulgas, bem como diferentes regiões geográficas (4).

Resultados de hibridização de DNA-DNA (3) mostraram que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são fortemente relacionadas por apresentarem mais de 90% de homologia, contra apenas 48% entre essas duas espécies e *Y. enterocolitica*. Em virtude destas semelhanças foi proposto que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* fossem reclassificadas em uma só espécie com duas subespécies (3). Entretanto, devido às diferenças quanto ao modo de transmissão, quadro clínico, nível de patogenicidade e de biossegurança a separação das duas espécies foi mantida. A comparação de seqüências de genes homólogos como os genes do rRNA 16S e genes reguladores e estruturais do lipopolissacarídeo (LPS), de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* revelam uma similaridade na seqüência de nucleotídeos de 97 a 99,7% (1, 12). Esses resultados sugerem que *Y. pestis* é um clone de uma cepa de *Y. pseudotuberculosis*, provavelmente sorotipo O:1b, que surgiu entre 1.500 a 20.000 anos atrás (1, 25). A razão das diferenças na virulência dessas duas espécies vem sendo alvo de muitos estudos; vários genes presentes nas duas espécies estão ativos em *Y. pseudotuberculosis* mas, mutados em *Y. pestis* (24, 25).

Entretanto, estudos recentes mostram que *Y. pestis* não é totalmente uniforme, o seu genoma é rico em seqüências de inserção (IS) que favorecem mutações através de deleções das ISs além de integração dos plasmídeos ao cromossoma, indicando freqüentes recombinações intragenômicas (20). Análises do perfil de restrição com a localização dos genes de IS100 (1) e do rRNA, revelam uma variabilidade relacionada com as três variedades geográficas (8). Com base no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes do rRNA, foram inicialmente identificados 16 ribotipos distintos em amostras de *Y. pestis* de diferentes focos do mundo (8). Posteriormente foi detectada a emergência de quatro novos ribotipos que surgiram recentemente durante um surto de peste na Índia (1 ribotipo), e outros três que surgiram em anos diferentes durante o atual surto de peste em Madagascar (9), sugerindo que perfis distintos do gene do rRNA podem se desenvolver em um curto período de tempo (menos de meio século), em uma área geográfica específica. As regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), especialmente as que estão

localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolucionária, logo apresentam uma maior variação genética que as regiões que codificam o rRNA (5).

Nosso objetivo foi investigar o polimorfismo das ISRs de amostras de *Y. enterocolítica* e *Y. pseudotuberculosis* e analisar amostras de *Y. pestis* de diferentes períodos epidemiológicos para verificar se a necessidade de adaptação aos diversos hospedeiros (homem, várias espécies de roedores e pulgas) nos diferentes focos brasileiros, teve alguma influência sobre a evolução de *Y. pestis* no Brasil.

Materiais e Métodos

Bactérias e condições de cultivo. Para este trabalho foram utilizadas 35 cepas de *Y. pestis* dos focos de peste do Nordeste do Brasil isoladas de casos humanos, de diferentes espécies de pulgas e de roedores, no período de 1966 a 1997, oito cepas originadas de outros países (Tabela 1), duas cepas de *Y. pseudotuberculosis* (YP 1553 O:6, YP 2944 O:3) e nove cepas de *Y. enterocolitica* (Tabela 2).

As culturas foram reativadas pelo semeio em caldo (Brain Heart Infusion broth, Difco: BHI) incubadas a 28°C por 48 horas e em seguida plaqueadas em meio gelose (Blood Agar Base, Difco: BAB). A identificação e a pureza das culturas de *Y. pestis* foram confirmadas pela sensibilidade ao fago antipestoso (2).

Testes de fermentação do glicerol e redução do nitrato. Para verificar a capacidade de fermentar o glicerol e reduzir o nitrato a nitrito das culturas de *Y. pestis*, 100 µl de cultura em BHI, crescida a 28 °C por 24 horas, foi inoculado em caldo (Phenol red broth, Difco) contendo glicerol (1%), incubado a 28°C por sete dias, e em caldo (Nutrient broth, Difco) contendo nitrato de potássio (KNO₃ 1%), incubado a 28°C por 72 horas (2).

Extração do DNA genômico. O DNA genômico das culturas foi extraído segundo protocolo baseado em Maniatis *et al.* (18) e quantificado após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando para comparação uma quantidade conhecida do DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III.

Amplificação das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S-23S. Foram utilizados dois conjuntos de “primers” desenhados com base nas seqüências complementares das regiões conservadas dos genes dos rRNAs 16S e 23S de várias espécies bacterianas (10). Os “primers”: 5'-TTGTACACACCGCCCGTA-3' e 5'-GGTACCTTAGATGTTTCAGTTA-3' (14), foram utilizados nas amplificações com o DNA de todas as amostras. Outro par de “primers” (5): 5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3' (região sublinhada indica um sítio de restrição para *Pst*I) e 5'-

ACGAATTCTGACTGCCMRGGCATCA-3' (região sublinhada indica um sítio de restrição para *EcoRI*), foi utilizado para amplificar as ISRs para posterior sequenciamento.

As reações foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA genômico, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl (pH8,0), 0,16mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-Pharmacia), 1,5mM de MgCl₂, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 20pmol de cada "primer", nas reações com os "primers" descritos por Kostman *et al.* (14) e submetidas à amplificação em um termociclador (Perkin Elmer) programado para 30 ciclos segundo descrito por Pereira *et al.*, (2002). Nas reações com os "primers" descritos por Chun *et al.* (5) foram utilizados 40 pmol de cada "primer" e os demais componentes nas concentrações descritas anteriormente, as reações foram realizadas em um termociclador (Biometra) programado para uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 30 ciclos correspondendo cada ciclo as etapas de: desnaturação do DNA por 1 minuto a 94°C, seguida do anelamento de 1 minuto a 50°C e alongamento de 1,5 minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato e voltagem constante de 100V, corados com brometo de etídio (15 mg/ml) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado o "100 base-pair DNA ladder" (Amersham Pharmacia Biotec).

Clivagem dos produtos de amplificação das ISRs. Os produtos de amplificação do DNA das culturas de *Y. pestis* P. CE 882; P. EXU 384, EV 76, PKR 684, da YP 2944 (*Y. pseudotuberculosis*) e da Ye 40 (*Y. enterocolitica*) com o conjunto de “primers” descrito por Kostman *et al.* (14), foram purificados com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), precipitados com etanol (100%) à -20°C por 30 minutos, quantificados nas condições descritas anteriormente, e em seguida clivados com as enzimas *Alu* I, *Hpa* II, *Msp* I e *Mbo* I em tampões recomendado pelo fabricante (Amersham Pharmacia Biotec), a 37°C por 24 horas. Os produtos da clivagem foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% nas condições descritas anteriormente.

Purificação dos segmentos das ISRs amplificados. Os segmentos das ISRs amplificados a partir do DNA das culturas de *Y. pestis*: P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, PKR 684 e P. Peru 375, e da YP 2944 (*Y. pseudotuberculosis*) com os “primers” descritos por Chun *et al.* (5), foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, recortados do gel e purificados com o kit “Concert gel extraction systems” (Life Technologies-GIBCO BRL) conforme instruções do fabricante. Os “amplicons” das ISRs purificados das culturas PKR 684, P. Peru 375 e YP 2944, foram utilizados para sequenciamento direto, sem envolver clonagem.

Clonagem. Os “amplicons” purificados das culturas: P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, foram clivados com as enzimas *Pst*I e *Eco*RI em tampão NE3 (Amersham Pharmacia Biotec) a 37°C por 12 horas e incubados por 15 minutos a 70°C, para inativar as enzimas. Os fragmentos ISRs digeridos, foram clonados em um plasmídeo vetor pré-digerido PTZ 18R (Pharmacia Biotec), e recircularizado por ação da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotec). Células competentes, *Escherichia coli* DH5 α , foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos contendo as diferentes ISRs, os clones recombinantes foram selecionados, em meio Agar LB IPTG-X-Gal contendo ampicilina (100 μ g ml⁻¹), de acordo com o procedimento padrão de colônias brancas ou azuis (23). Os clones selecionados foram crescidos em caldo LB (Luria Bertani broth, Difco: LB) contendo ampicilina (100 μ g ml⁻¹), e os

plasmídeos contendo os fragmentos foram extraídos em maxi-preparações segundo Sambrook *et al.* (23) e purificados com o “kit Concert high purity plasmid purification systems” (Life Technologies-GIBCO BRL). O tamanho dos insertos foi confirmado em gel de agarose 1% após o tratamento com *EcoRI* - *PstI*.

Sequenciamento. As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos das ISRs clonados e não clonados foram determinadas empregando os “Kits Auto read sequencing” e “Thermo sequenase Cy5 Dye terminator cycle sequencing”, respectivamente (Amersham Pharmacia Biotec) em um seqüenciador automático “ALFexpress DNA sequencing” (Amersham Pharmacia Biotec). Para os fragmentos das ISRs não clonados foi empregado um dos “primers” (5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3') utilizados na reação de ribotipagem por PCR.

Análise das seqüências. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando os programas de pesquisa “online” BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do Sanger Center (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Y_pestis/blastserver.shtml).

Resultados

Variedades geográficas. Das 35 cepas brasileiras de *Y. pestis* analisadas, 33 reduziram o nitrato a nitrito e não fermentaram o glicerol, sendo enquadradas na variedade Orientalis (Tabela 1). Apenas duas (P. Exu 246 e P. Exu 792) não fermentam o glicerol nem reduzem o nitrato, sendo consideradas atípicas.

Entre as oito cepas de outros países duas (PKR 684 e KIM) fermentaram o glicerol mas não reduziram o nitrato a nitrito, sendo classificadas na variedade Medievalis, e as demais foram classificadas na variedade Orientalis (Tabela 1).

Ribotipagem por PCR. Através da ribotipagem por PCR com o conjunto de “primers” descrito por Kostman *et al.* (14) as 35 cepas brasileiras e as 8 cepas estrangeiras de *Y. pestis* analisadas exibiram o mesmo perfil de amplificação,

caracterizado pela presença de seis bandas medindo de 800 a > 2000 pares de base (pb) (Figura 1a). As duas cepas atípicas, glicerol negativa e nitrato negativa, (P. Exu 246 e P. Exu 792), também apresentaram o mesmo perfil de amplificação. As cepas de *Y. pseudotuberculosis* exibiram o mesmo perfil de ribotipagem encontrado nas cepas de *Y. pestis* (Figura 1b).

As nove amostras de *Y. enterocolitica* analisadas mostraram quatro perfis de ribotipagem distintos, denominados neste estudo de Yr1 a Yr4 (Tabela 2, Figura 2). As seis cepas de um mesmo sorotipo (O:3) e igual origem (suíno), apresentaram três perfis de ribotipagem e das três cepas de origem humana de diferentes sorotipos, duas apresentaram perfil de ribotipagem semelhante e uma mostrou um perfil de ribotipagem igual ao observado em uma cepa de suíno (Tabela 2).

Com o conjunto de “primers” descrito por Chun *et al.* (5) todas as cepas de *Y. pestis* (P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, PKR 684 e P. Peru 375) e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944) analisadas também exibiram igual perfil de amplificação, caracterizado pela presença de duas bandas nítidas, uma maior que mede mais que 600 pb e outra menor medindo cerca de 550 pb (Figura 3). Adicionalmente, duas bandas fracas > 800pb foram exibidas igualmente nas duas espécies.

Perfil de clivagem. Os produtos de amplificação com os “primers” descritos por Kostman *et al.* (14) e as cepas de *Y. pestis* brasileiras (P. CE 882, P. Exu 384), e estrangeiras (EV 76, PKR 684 e KIM) de diferentes biovar e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944), clivadas com as enzimas *Hpa* II *Msp* I e *Mbo* I, apresentaram o mesmo perfil, sendo observado um perfil de restrição característico para cada enzima (Figura 4). A clivagem das ISRs com a enzima *Alu* I produziu um padrão de bandas iguais com as diferentes cepas de *Y. pestis* analisadas e padrões diferentes com as cepas de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944) e *Y. enterocolitica* (Ye 40) mostrando um polimorfismo intraespecífico (Figura 5).

Análise das seqüências. O resultado da análise das seqüências dos dois “amplicons” obtidos com os “primers” descritos por Chun *et al.* (5), demonstrou que o amplicon maior (>600 pb), designado ISR-1, resultou em seqüências de

419 a 782 nucleotídeos nas diferentes cepas analisadas (Tabela 3). Em todas as cepas de *Y. pestis* (P. EXU 788, P. EXU 792, P. EXU 882, PKR 684, P. Peru 375) e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944), analisadas neste estudo a ISR-1 mostrou três genes de tRNA (tDNAs) que codificam para tRNA^{Ala(GGC)}, tRNA^{Ala(TGC)} e tRNA^{Ile(GAT)}, respectivamente, com seus anticódons indicados entre parêntesis. A ISR menor, um “amplicon” com cerca de 550 pb variou de 311 a 685 nucleotídeos de comprimento, designado ISR-2, mostrou-se igualmente invariável, apresentando em todas as cepas de *Y. pestis* e na cepa de *Y. pseudotuberculosis* um único gene de tRNA (tDNA) que codifica para a síntese do tRNA^{Glu(TTC)} (Tabela 3). A sequência ISR-1 mostrou uma similaridade, da sequência completa dos tRNAs^{Ala}, tRNA^{Ile} e das sequências parciais dos genes dos rRNAs 16S e 23S, com as sequências de diversos gêneros e espécies bacterianas, entre elas as cepas de *Y. pestis* CO92 (USA) e KIM (Iran), e *Y. pseudotuberculosis* cepa PB1/+, através do programa BLAST. A sequência ISR-2 mostrou similaridades da sequência completa do tRNA^{Glu} e das sequências parciais dos genes dos rRNAs 16S e 23S, com as sequências de diversos gêneros e espécies bacterianas, além da similaridade com as cepas de *Y. pestis* CO92, KIM e a PB1/+ (*Y. pseudotuberculosis*) mostrou similaridade também com a cepa YP 8081 (*Y. enterocolitica*).

Discussão

Os resultados das reações de fermentação do glicerol e redução do nitrato, mostraram que a maioria das amostras de *Y. pestis* brasileiras estudadas se enquadra na variedade Orientalis (G⁻, N⁺) correspondendo à cepa que se supõe ter sido disseminada durante a última pandemia (7). Duas cepas (P. Exu 246 e P. Exu 792) não se enquadram nessa variedade porque não fermentam o glicerol nem reduzem o nitrato. Esta variedade (G⁻, N⁻) também não se enquadra nas outras duas variedades (G⁺, N⁺ e G⁺, N⁻) descritas por Devignat (1951) sendo consideradas atípicas. Esta característica (G⁻, N⁻) havia sido encontrada em outras cepas brasileiras (13) e na Birmânia (11).

Através da ribotipagem por PCR com dois conjuntos de “primers” diferentes, nenhum polimorfismo foi detectado nas regiões espaçadoras intergênicas das cepas de *Y. pestis* estudadas, brasileiras ou estrangeiras, e

mesmo entre as cepas de diferentes variedades geográficas (biovar *Medievalis* e *Orientalis*). Pelo polimorfismo dos fragmentos de restrição, cepas dos três diferentes biovar se enquadram em diferentes ribotipos (8). Por ocasião do atual surto de peste em Madagascar três novos ribotipos foram descritos; essas cepas foram isoladas em diferentes anos e exibiram perfis plasmidiais e perfis genômicos de restrição específicos, sugerindo evolução do bacilo em seu ambiente natural (9).

Uma análise do perfil plasmidial das cepas de *Y. pestis* do Nordeste do Brasil mostra que a maioria apresenta os três plasmídeos típicos (pFra, pYV e pPst); entretanto, foi detectada a ausência de plasmídeos em algumas cepas e a presença de bandas de DNA adicionais. A ocorrência de bandas de DNA extra nessas cepas não foi relacionada a nenhuma característica epidemiológica relevante (15). Provavelmente as mesmas resultam de rearranjos dos plasmídeos típicos (multímeros do pPst, formas lineares do pYV e do pFra), que ocorreram durante a estocagem, após o isolamento (16).

Os padrões de bandas das ISRs gerados por PCR de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* foram idênticos reforçando a alta homologia de DNA/DNA (90%) entre estas espécies, e que as mesmas constituem uma única espécie genômica (3), apesar das diferenças existentes sob o ponto de vista clínico entre as duas espécies. Por outro lado, os quadros clínicos produzidos por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são bem mais parecidos, embora a homologia entre estas espécies seja de apenas 48%.

Y. enterocolitica é uma espécie muito heterogênea, pois existem vários biotipos, fagotipos e numerosos sorotipos. Além disso, foram encontrados variantes dentro dos sorotipos por ribotipagem (19) e por RAPD-PCR (17). As amostras de *Y. enterocolitica* estudadas neste trabalho foram agrupadas em quatro ribotipos diferentes dos encontrados nas cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Através da técnica de RAPD-PCR essas mesmas cepas haviam sido classificadas em cinco grupos genotípicos (17). Os resultados do presente trabalho confirmam o polimorfismo genético observado, entretanto, não foi possível relacionar os perfis de ribotipagem obtidos com os perfis de RAPD-PCR.

Nenhum polimorfismo foi detectado no perfil de clivagem das ISRs das diferentes cepas de *Y. pestis* brasileiras e estrangeiras de diferentes biovar e a

cepa de *Y. pseudotuberculosis*, com as enzimas *Hpa* II *Msp* I e *Mbo* I. A clivagem dos produtos de amplificação das ISRs com a enzima *Alu* I, utilizada neste estudo, produziu padrões diferentes, possibilitando a diferenciação interespecífica entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Outros estudos que avaliam os padrões de restrição de *Eco*RI dos genes de rRNA de cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* também apontam esta diferenciação (8).

A sequência do rDNA 16S mostra-se altamente conservada nas diversas espécies de yersínias (12). Entretanto, foi descrita uma região de variabilidade intergenérica e duas regiões de variabilidade intragenérica. Embora não tenha sido observada variação entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* para esta região, foi demonstrada uma variação de uma base na região variável do rDNA 23S destas duas espécies (26).

Os genes de tRNA nas ISR-1 e ISR-2 variaram em número e tipo do tRNA codificados caracterizando a ocorrência de tipos distintos de operons de rRNA que ocorrem igualmente em *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. As sequências de nucleotídeos das ISRs das duas espécies demonstraram um elevado índice de similaridade exibindo os mesmos tipos de tRNAs, corroborando com a hipótese de que *Y. pestis* é um clone de *Y. pseudotuberculosis* que evoluiu recentemente, e que ainda compartilha muitas sequências homólogas com *Y. pseudotuberculosis* (1). Entretanto, a clivagem dos “amplicons” das ISRs das amostras destas duas espécies, com a enzima *Alu* I demonstrou um polimorfismo entre elas, indicando que apesar da similaridade observada quanto ao número e tipos de tRNAs codificados nas ISRs estas duas espécies apresentam uma variação ao nível de ISR, correspondendo a uma relação de conservação ou perda de sítios de restrição para a enzima *Alu* I nos operons do rRNA de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, o que pode caracterizar uma microevolução entre elas.

Apenas a banda ISR-2 mostrou similaridade com as três espécies patogênicas do gênero, enquanto que a banda ISR-1 apresentou homologia com cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, mas não com cepas de *Y. enterocolitica*. A similaridade de ISR-1 e ISR-2, demonstrada entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* reforça a identidade genética observada nestas duas espécies e sugere que ISR-1 pode ser mais um candidato a maiores

investigações para ser usado como ferramenta epidemiológica para acompanhar a evolução de surtos de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*.

A similaridade observada entre as amostras de *Y. pestis*, de diversos focos, origens e períodos de isolamento, analisadas neste estudo reflete a natureza clonal desta bactéria, característica de muitos patógenos que sofrem elevadas pressões seletivas.

Referências

1. **Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad Sci. USA. **96**:14043-14048.
2. **Bahmanyar, M., and D.C. Cavanaugh.** 1976. Plague Manual. World Health Organization, p.76.
3. **Bercovier, H., H.H. Mollaret, J.M. Alonso, J. Brault, G.R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and relationship to *Y. pseudotuberculosis*. Curr. Microbiol. **4**:225-229.
4. **Carniel, E., and H.H., Mollaret.** 1990. Yersiniosis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. **13**: 51-58.
5. **Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwel.** 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2202-2208.
6. **Cornelis, G.R.** 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. Proc. Natl. Acad Sci. USA. **97**:8878-8783.
7. **Devignat, R.** 1951. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. Bull. Wld. Hlth. Org. **4**:247-263.
8. **Guiyoule, A., F. Grimont, I. Itean, P.A.D. Grimont, M. Lefèvre, and E. Carniel.** 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. J. Clin. Microbiol. **32**:634-641.

9. **Guiyoule, A., B. Rasoamanana, C. Buchrieser, P. Michel, S. Chanteau, and E. Carniel.** 1997. Recent emergence of new variant of *Yersinia pestis* in Madagascar. J. Clin. Microbiol. **35**:2826-2833.
10. **Grimont, F. and P.A.D. Grimont.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. **137B**:165-175.
11. **Hudson, B.W., and T.J. Quan.** 1975. Eletrophoretic studies of the Yersiniae. Amer. J. Trop. Med. Hyg. **24**:968-973.
12. **Ibrahim, A., B.M. Goebel, W. Liesack, M. Griffiths, and E. Stackebrandt.** 1993. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S sequences. FEMS Microbiol. Lett. **114**:173-178.
13. **Karimi, Y., C.R. Almeida, A.M.P. Almeida, A. Keyvanfar, and M. Bourdin.** 1974. Particularités des souches de *Yersinia pestis* isolées dans le nord-est du Brésil. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. **125 A**:243-246.
14. **Kostmam, J.R, T.D. Edlind, J.J. LiPuma, and T.L. Stull.** 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J. Clin. Microbiol. **30**: 2082-2087.
15. **Leal, N.C., A.M.P. Almeida, R.C.L. Farias, M. Sobreira, T.C.A. Leal, and L.C.S. Ferreira.** 1997. Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in Northeast Brazil. Rev. Microbiol. **28**:40-45.
16. **Leal, N.C., M. Sobreira, T.C.A. Leal, and A.M.P. Almeida.** 2000. Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in brazilian *Yersinia pestis* strains. Braz. J. Microbiol. **31**:20-24.
17. **Leal, T.C.A., N.C. Leal, and A.M.P. Almeida.** 1999. RAPD-PCR typing of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) O:3 serotype strains isolated from pigs and humans. Genetics Mol. Biol. **22**:315-319.

18. **Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
19. **Mendoza, M.C., R. Alzugaray, E. Landeras, and M.A. González-Hevia.** 1996. Discriminatory power and application of ribotyping of *Yersinia enterocolitica* O:3 in an epidemiological study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15**: 220-226.
20. **Parkhill, J., B.W. Wren, N.R. Thompson, R.W. Titball, M.T.G. Holden, M.B. Prentice, M. Sebaihia, K.D. James, C. Churcher, K.L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S.D. Bentley, K. Brooks, A.M. Cerdeño-Tárraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R.M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P.C.F. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B.G. Barrell.** 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative of plague. Nature. **413**: 523-527.
21. **Pereira, M.S.V., N.C. Leal, T.C.A. Leal, M. Sobreira, A.M.P. Almeida, J.P. Siqueira-Júnior, and G.M. Campos-Takaki.** 2002. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Lett. Appl. Microbiol. **In press**.
22. **Perry, R., and J.D. Fetherston.** 1997. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. **10**:35-66.
23. **Sambrook, J., and D. Russell.** 2001. Molecular cloning a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
24. **Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet.** 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at specific position in the *ureD* gene. Infect. Immun. **69**:170-176.

25. **Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervalä.** 2000. Characterization of O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene clusters of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O-1b. *Mol. Microbiol.* **2**:316-330.
26. **Trebesius, K., D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, and J. Heesemann.** 1998. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2557-2564.
27. **WHO PAHO.** 1965. Plague in the Americas. Scientific Publication. **115**:44-68.
28. **WHO OMS.** 2000. Human plague in 1998 and 1999. *Wkly. Epid. Recor.* **75**: 338-343.

Tabela 1. Origem e características das cepas de *Yersinia pestis* estudadas.

Cepas	Origem			Reação		Biovar
	Fonte	Foco	Ano	Glicerol	Nitrato	
P. Exu 538	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 540	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 554	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 556	Humano	Ibiapaba	1972	-	+	Orientalis
P. Exu 789	Humano	Ibiapaba	1978	-	+	Orientalis
P. Exu 792	Humano	Ibiapaba	1978	-	-	Atípica
P. Exu 809	Humano	Ibiapaba	1979	-	+	Orientalis
P. CE 21	Humano	Ibiapaba	1982	-	+	Orientalis
P. Exu 882	Humano	Ibiapaba	1997	-	+	Orientalis
P. Exu 16	Humano	Triunfo	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 17	Humano	Triunfo	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 248	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 249	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 292	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 351	Humano	Triunfo	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 841	Humano	Triunfo	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 185	Humano	Borborema	1967	-	+	Orientalis
P. PB 862	Humano	Borborema	1986	-	+	Orientalis
P. Exu 825	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 832	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 827	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis

Continua...

Continuação

Cepas	Origem			Reação		Biovar
	Fonte	Foco	Ano	Glicerol	Nitrato	
P. Exu 15	Humano	Araripe	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 246	Humano	Araripe	1968	-	-	Atípica
P. Exu 276	Humano	Araripe	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 312	Humano	Araripe	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 334	Humano	Araripe	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 384	Pulga	Araripe	1970	-	+	Orientalis
P. Exu 674	Humano	Araripe	1974	-	+	Orientalis
P. Exu 738	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 769	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 771	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 778	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 781	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 788	Pulga	Araripe	1977	-	+	Orientalis
P. Exu 796	Humano	Baturité	1978	-	+	Orientalis
PKR 684	Roedor	Iran	S/i	+	-	Medievalis
KIM	Humano	Iran	S/i	+	-	Medievalis
PBM5	S/i	Birmania	S/i	-	+	Orientalis
PKOL	S/i	Curdistão	S/i	-	+	Orientalis
PB 8	S/i	Birmania	S/i	-	+	Orientalis
P. Peru 375	Humano	Peru	1995	-	+	Orientalis
Alexander	Humano	USA	S/i	-	+	Orientalis
EV 76	Humano	Madagascar	1926	-	+	Orientalis

S/i: sem informação

Tabela 2. Características das cepas de *Yersinia enterocolitica* analisadas.

Cepas	Fonte	Sorotipo	RAPD-PCR (Leal et al., 1999)	Ribotipo
Ye 5a	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr1
Ye 25L	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 25c	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 37	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 40	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr3
Ye 41	Suíno	0:3	Perfil genotípico 2	Yr3
Ye 43p	Humano	0:6	Perfil genotípico 1	Yr4
Ye 102p	Humano	0:5	Perfil genotípico 5	Yr1
Ye 124p	Humano	0:4	Perfil genotípico 4	Yr4

Tabela 3. Informações sobre o sequenciamento das ISR-1 e ISR-2 das diferentes cepas de *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*.

Cepas	Espécie	ISR-1		ISR-2	
		Tamanho (pb)	tRNAs	Tamanho (pb)	tRNAs
P. EXU 788	<i>Y. pestis</i>	662	tRNA ^{Ala} (GGC) tRNA ^{Ala} (TGC) tRNA ^{Ile} (GAT)	603	tRNA ^{Glu} (TTC)
P. EXU 792	<i>Y. pestis</i>	677	tRNA ^{Ala} (GGC) tRNA ^{Ala} (TGC) tRNA ^{Ile} (GAT)	685	tRNA ^{Glu} (TTC)
P. EXU 882	<i>Y. pestis</i>	NR	NR	497	tRNA ^{Glu} (TTC)
PKR 684	<i>Y. pestis</i>	782	tRNA ^{Ala} (GGC) tRNA ^{Ala} (TGC) tRNA ^{Ile} (GAT)	490	tRNA ^{Glu} (TTC)
P. Peru 375	<i>Y. pestis</i>	724	tRNA ^{Ala} (GGC) tRNA ^{Ala} (TGC) tRNA ^{Ile} (GAT)	311	tRNA ^{Glu} (TTC)
YP 2944	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	419	tRNA ^{Ala} (GGC) tRNA ^{Ala} (TGC) tRNA ^{Ile} (GAT)	500	tRNA ^{Glu} (TTC)

NR- Não realizado

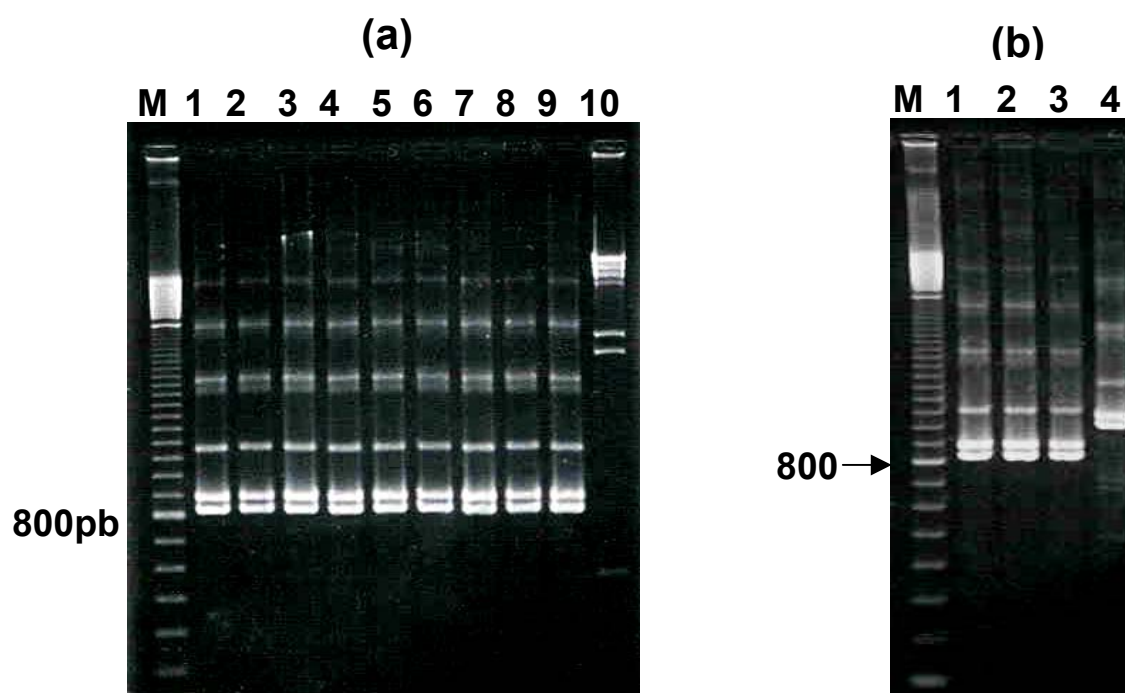


Figura 1 (a, b). Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Kostman *et al.*,1992) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia pestis*. Linha, M: “100pb DNA ladder”; **(a)**- Linhas, 1: P Exu 17; 2: P CE 21; 3: P Exu 538; 4: P Exu 554; 5: P Exu 556; 6: P Exu 789; 7: P Exu 792; 8: P Exu 796; 9: P Exu 809; 10: DNA do fago λ clivado com a enzima *HindIII*. **(b)**-Linhas, 1: EV76; 2: P Exu 882; 3: *Yersinia pseudotuberculosis* (YP 2944); 4: *Yersinia enterocolitica* (Ye 37).

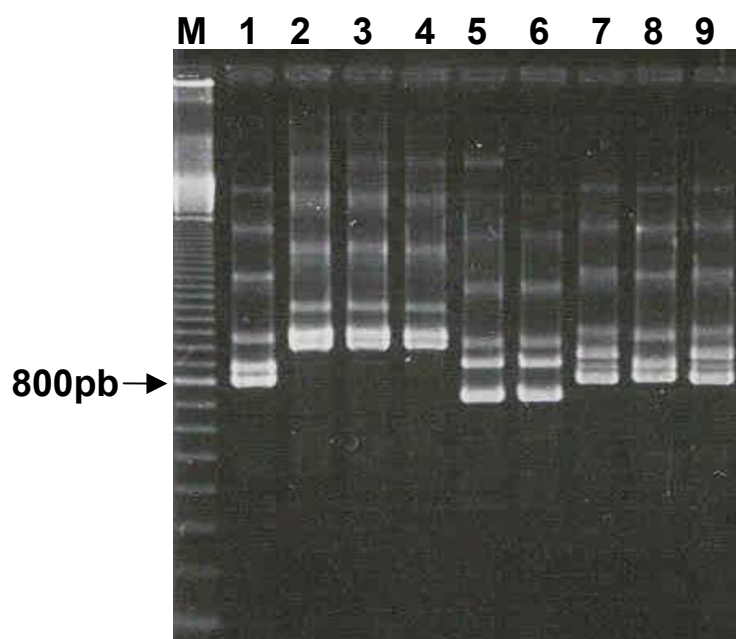


Figura 2. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Kostman *et al.*,1992) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia enterocolitica*. Linhas, M: “100pb DNA ladder”; 1: Ye 5a; 2: Ye 25L; 3: Ye 25c; 4: Ye 37; 5: Ye 40; 6: Ye 41; 7: Ye 43p; 8: Ye 102p; 9: Ye 124p.

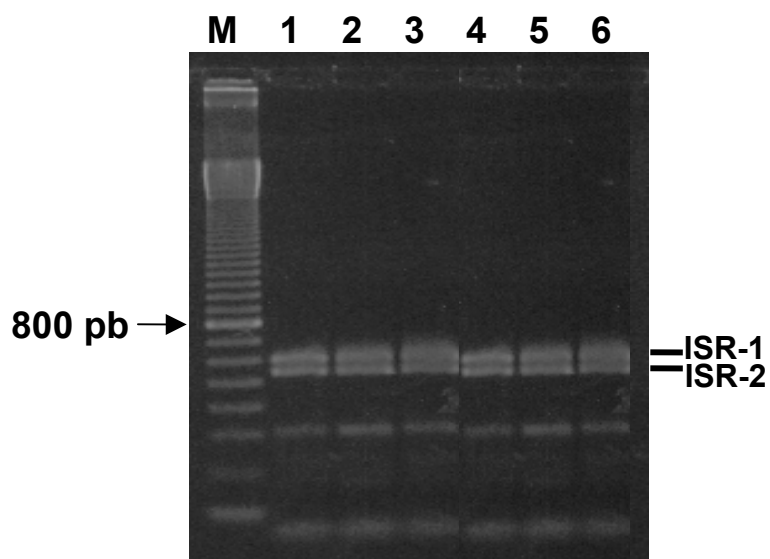


Figura 3. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Chun *et al.*, 1999) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Linhas, M: “100pb DNA ladder”; 1: P. EXU 788; 2: P. EXU 792; 3: P. EXU 882; 4: PKR 684; 5: P. Peru 375; 6: YP 2944.

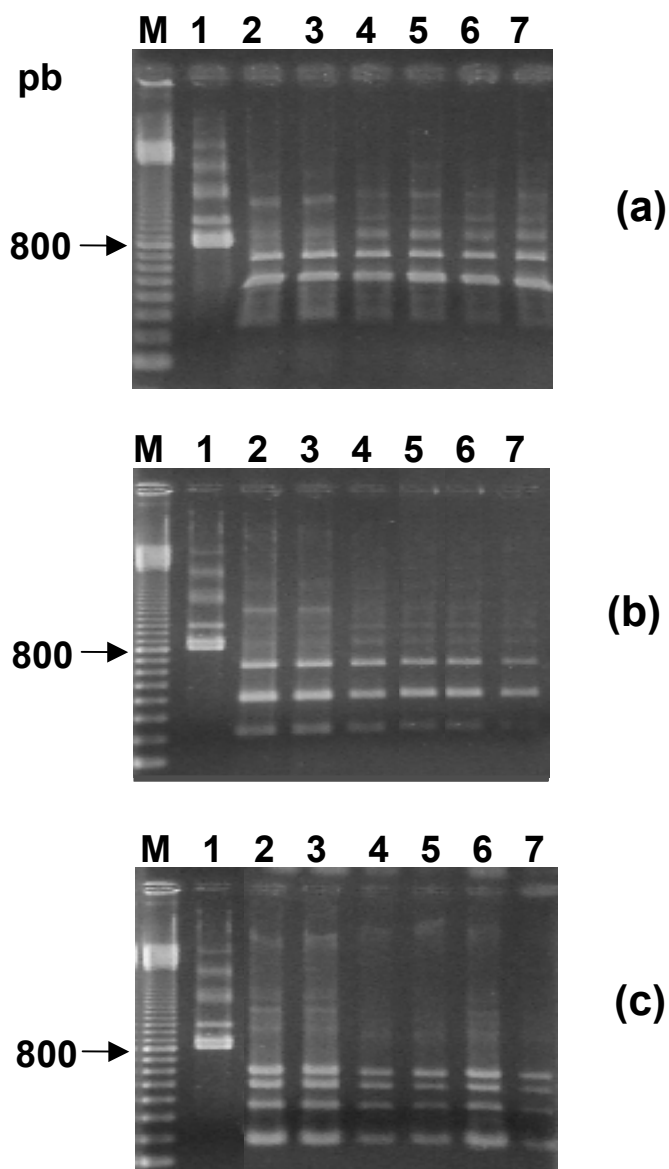


Figura 4 (a, b, c). Géis de Agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas, clivado com as enzimas *Msp* I (a); *Hpa* II (b); *Mbo* I (c). Linhas, 1: P. CE 882 (DNA não clivado); 2: P. CE 882; 3: P. Exu 384; 4: EV 76; 5: PKR 684; 6: KIM; 7: YP 2944.

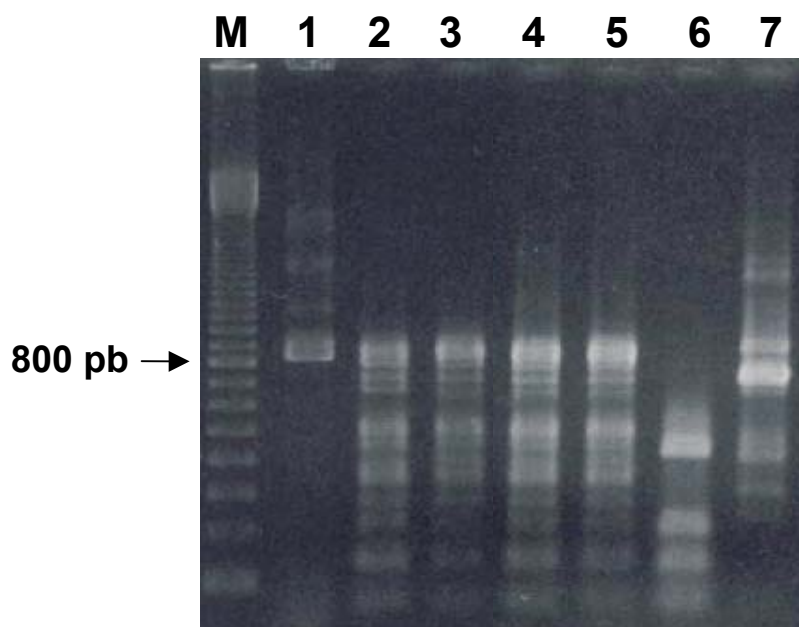


Figura 5. Gel de Agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), clivado com a enzima *Alu* I; Linhas, M: “100 pb DNA ladder”; 1: P. Exu 351 (DNA não clivado); 2: P. CE 882; 3: P. Exu 384; 4: P. Peru 375; 5: KIM; 6: YP 2944; 7: Ye 40.

CONCLUSÕES

A partir da análise das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) do rDNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos, conclui-se que:

1. *Staphylococcus aureus* apresenta grande polimorfismo genético, considerando o pequeno número de amostras estudadas e o número de ribotipos identificados.
2. *Providencia alcalifaciens* revelou grande heterogeneidade genética refletindo a origem das amostras estudadas obtidas de casos esporádicos, não relacionados, de gastroenterites.
3. *Y. enterocolitica* também revelou polimorfismo genético, sendo evidenciados quatro ribotipos entre as amostras estudadas.
4. *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* possuem grande homologia genômica, produziram padrões de amplificação das ISRs idênticos e igual número e tipos de tRNA.
5. A clivagem dos “amplicons” de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* com a enzima *Alu I* resultou em padrões diferentes, possibilitando a diferenciação das duas espécies o que caracteriza uma microevolução entre elas.
6. A similaridade observada entre as diversas amostras de *Y. pestis* estudadas reflete a natureza clonal deste patógeno.

PERSPECTIVAS

A ribotipagem através da análise do RFLP utilizando sondas para o rRNA, além das regiões espaçadoras analisadas na ribotipagem-PCR, avalia o perfil de restrição dos genes 16S e 23S do rRNA. Como os genes de rRNA apresentam regiões muito conservadas e regiões variáveis essa técnica pode detectar um maior polimorfismo.

Assim como, a análise de restrição do DNA genômico utilizando sondas derivadas de seqüências de inserção (IS), em especial em *Y. pestis* que apresenta muitas ISs no seu genoma favorecendo recombinações intragenômicas, é utilizada para avaliar a variabilidade genética.

Visto que existe uma grande similaridade nas regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S entre as diversas amostras de *Y. pestis* estudadas. Visamos implantar a técnica de análise de restrição do DNA genômico utilizando sondas para o rRNA e para seqüências de inserção (IS100), para avaliar o polimorfismo genético entre amostras de *Y. pestis* brasileiras e aplicar ao estudo de outras bactérias patogênicas humanas de interesse regional.

ANEXOS

The Journal of Medical Microbiology

A Journal of the Society for General Microbiology

Information for Authors

Manuscript submission: The Journal will consider manuscripts written in English, of original unpublished work in all aspects of microbiology relevant to human or veterinary medicine or dentistry. Two copies of the manuscript and good quality figures must be sent to the Editors, Journal of Medical Microbiology, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG.

Please send a disk if possible (Microsoft Word or text files, in IBM-compatible format, preferably). Authors should retain an additional copy of the manuscript and figures. Upon acceptance of a manuscript for publication, a copyright transfer form will be sent to the author(s) with the proofs. This transfer form must be signed and dated by all authors or by the senior author on behalf of all authors and returned to the publisher.

Manuscript preparation: Use double spacing throughout. Organise the manuscript in the order indicated below, with each component beginning on a separate page and with a page number typed in the upper right-hand corner of each page.

Title page: Page 1 should include: (a) the title of the article; (b) the authors' names; (c) affiliations (the name of the department, if any, institution, city and state or country where the work was done) indicating which authors are associated with which affiliations; (d) the name and address of the author to whom proofs and reprint requests are to be **sent including the street address and fax number;** and (e) running title.

Abstract: Page 2 should include the title of the article followed by the abstract. The abstract should state the purpose of the study, basic procedures, most important findings, and principle conclusions, with an emphasis on the new aspects of the study.

Text: Papers should be organised in the following format: Introduction, Materials (or patients) and Methods, Results and Discussion. Other descriptive headings and sub-headings may be used if appropriate. Every effort should be made to avoid jargon, to spell out all non-standard abbreviations the first time they are mentioned and to present the contents of the study as clearly and as concisely as possible. Please give the name and address of manufacturers of commercial products cited in the text. Be sure that all references are cited in numerical order in the text and that all tables and figures cited in the text are numbered according to the order in which they appear. Data appearing in tables or figures should be summarised, not duplicated, in the text. All data cited in the text should be checked carefully against the corresponding data in the tables to ensure that they correspond, and any names cited in the text should be checked carefully against the references to ensure that the spelling is correct. Any ambiguous symbols (e.g. the letter 'O' versus the numeral '0', the letter 'I', versus the number '1') should be identified. Acknowledgements of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study should be included at the end of the text.

References: Type references double spaced and number them consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, not alphabetically. Identify references in the text, tables and legends by Arabic numerals in square brackets.

References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first mention in the text of a particular table or figure. For journal articles the following information should be included: (a) all author names (surnames followed by initials) up to six (for more than six, give first three names followed by *et al.*), (b) title of the article with the same spellings and accent marks as in the original, (c) the journal title abbreviated, (d) the year of publication, (e) the volume number and (f) the page numbers. For books, give the chapter authors, chapter title, editors of the book, title of the book (including volume and edition number), publisher's location and name, year of publication, and appropriate page numbers. Examples of the correct format are as follows:

1. Gillespie SH, Ainscough S, Dickens A, Lewin J. Phosphorylcholine-containing antigens in bacteria from the mouth and respiratory tract. *J Med Microbiol* 1996; **44**: 35–40.

2. Lindahl G, Hedén L-O, Stenberg L. Streptococcal IgA receptors. In: Korhonen TK, Mäkelä PH, Hovi T (eds) *Molecular recognition in host-parasite interactions*. New York, Plenum Press. 1992: 77–83.

‘Unpublished observations’ and ‘personal communications’ should not appear in the references. These should be inserted in parentheses in the text, and letters of permission from all individuals cited in this way should accompany the manuscript. Information from manuscripts that have been submitted for publication but not yet accepted must be cited as “unpublished observations.” Manuscripts that have been accepted for publication but have not yet been published may appear in the references: include the authors, manuscript title, and name of the journal followed by ‘in press’ in parentheses.

Tables and Figures: Tables should be marked in the order in which they are first mentioned in the text in Arabic numerals. Every column in the table should have a clearly understandable heading. Define all abbreviations and indicate the units of measurement for all values. Indicate spaces without data in tables by Indicate footnotes to the table with the superscript symbols (*, †, ‡, §) cited in order as you read the table horizontally.

Figures should be professionally drawn and numbered with Arabic numerals. Letters, numbers and symbols should be clear throughout and should be large enough to remain legible when reduced for publication. Ensure that all spelling is correct, that there are no broken letters or uneven type, and that abbreviations used are consistent with those in the text.

Photomicrographs must include a calibration bar of appropriate length (e.g. 1mm, 0.1mm, etc.). Symbols used in micrographs should contrast with the background. Four-colour illustrations are acceptable, but the author will be required to bear the costs of their publication.

Legends should be typed double spaced and numbered with Arabic numerals corresponding to the illustration.

Studies on human subjects and animals: Experimental studies on human subjects must have been conducted in an ethical manner and manuscripts should include details of approval by appropriate research ethics committees or equivalent. Similarly, experiments involving animals must avoid distress to the animals and must have been conducted under appropriate licensing/approval arrangements, details of which should be included.

Production Process: Decisions of the Editor are final. All material accepted for publication is subject to copyediting. Authors will receive page proofs of their article before publication, and should answer all queries and carefully check all editorial

changes at this point. Authors are responsible for the scientific content of their article. Authors of all articles except Letters to the Editor and Abstracts will receive 25 free reprints. Additional reprints may be ordered directly from the publisher. An order form will be sent with the page proofs.

The original manuscript and figures will be discarded one month after publication unless the publisher is requested to return original material to the author.

The validity of the data and views expressed in journal articles are the responsibilities of authors and not of the Editors, the Society for General Microbiology, or of the Publisher.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

INSTRUCTIONS TO AUTHORS*

HOW TO SUBMIT MANUSCRIPTS

Submit manuscripts directly to: Journals Department, American Society for Microbiology, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904. *Since all submissions must be processed through this office, alternate routings, such as to an editor, will delay initiation of the review process.* The manuscript must be accompanied by a **cover letter** stating the following: the journal to which the manuscript is being submitted; the most appropriate section of the journal; the complete mailing address (including the street), e-mail address, and telephone and fax numbers of the corresponding author; and the former ASM manuscript number and year if it is a resubmission. The current e-mail addresses of the coauthors should also be indicated.

Submit **three** complete hard copies of each manuscript, including figures and tables. (You **must** submit your manuscript on disk at the *modification stage* [see p. v].) Type every portion of the manuscript **double spaced** (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and References, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages must have margins of at least 1 inch on all four sides and should have line numbers if possible. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter "oh" (O); the numeral one (1), the letter "el" (l), and the letter "eye" (I); and a multiplication sign (×) and the letter "ex" (x). If such distinctions cannot be made, please mark these items at the first occurrence for cell lines, strain and genetic designations, viruses, etc., on the modified manuscript so that they may be identified properly for the printer by the copy editor. See p. x for detailed instructions about illustrations.

Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript should be enclosed to facilitate the review. Three copies of each such manuscript should be provided.

Authors unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language. Manuscripts may be rejected on the basis of poor English or lack of conformity to accepted standards of style.

EDITORIAL POLICY

Manuscripts submitted to the journal must represent reports of original research, and the original data must be available for review by the editor if necessary.

All authors of a manuscript must have agreed to its submission and are responsible for its content, including appropriate citations and acknowledgments, and must also have agreed that the corresponding author has the authority to act on their behalf on all matters pertaining to publication of the manuscript. The corresponding author is responsible for obtaining such agreements. For Authors' Corrections and Retractions, signed letters of agreement from all of the authors must be submitted (see p. x).

By submission of a manuscript to the journal, the authors guarantee that they have the authority to publish the work and that the manuscript, or one with substantially the same content, was not published previously, is not being considered or published elsewhere, and was not rejected on scientific grounds by another ASM journal.

It is expected that the authors will provide written assurance that permission to cite unpublished data or personal communications has been granted.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

Primary Publication

A scientific paper *or its substance* published in a serial, periodical, book, conference report, symposium proceeding, or technical bulletin, posted on a nonpersonal website, or made available through any other retrievable source, including CD-ROM and other electronic forms, is unacceptable for submission to an ASM journal on grounds of prior publication.

Posting of a method/protocol on a nonpersonal website should not interfere with the author's ability to have a manuscript utilizing that technique considered for publication in an ASM journal; however, ultimately, it is an editorial decision whether the method constitutes the substance of a paper.

Posting of a limited amount of original data on a personal/university/company website, and websites of small collaborative groups working on a problem, does not preclude subsequent submission to, and publication by, an ASM journal. The posted data, however, may not constitute the substance of the submission. Specific questions about this policy may be referred to the Publications Board chairman, on a case-by-case basis. Posting of theses and dissertations on a personal/university website does not preclude subsequent submission to, and publication by, an ASM journal.

Posting of unpublished sequence data on the Internet is usually not considered prior publication; however, the address (URL) of the source of the sequence should be included in the text.

* Shading indicates material that has been added or updated.

A preliminary disclosure of research findings published in standard abstract form as an adjunct to a meeting, e.g., part of a program, is not considered prior publication. Disclosure of research findings as an “extended abstract” in a publication that is provided as an adjunct to a meeting or subsequent to a meeting may be considered prior publication. Ultimately, it is an editorial decision whether the material constitutes the substance of a paper.

It is incumbent upon the author to acknowledge any prior publication of the data contained in a manuscript submitted to an ASM journal. A copy of the relevant work should accompany the paper.

Permissions

The corresponding author is responsible for obtaining permission from both the original author and the original publisher (i.e., the copyright owner) to reproduce or modify figures and tables and to reproduce text (in whole or in part) from previous publications.

The signed permissions must be submitted to ASM and should be identified as to the relevant item in the ASM manuscript (e.g., “permissions for Fig. 1 in JCM 123-02”). In addition, a statement indicating that the material is being reprinted with permission must be included in the relevant figure legend or table footnote of the manuscript. Reprinted text must be enclosed in quotation marks, and the permission statement must be included as running text or indicated parenthetically.

Authorship

An author is one who made a substantial contribution to the overall design and execution of the experiments; therefore, ASM considers all authors responsible for the entire paper. Individuals who provided assistance, e.g., supplied strains or reagents or critiqued the paper, need not be listed as authors but may be recognized in the Acknowledgments section.

All authors must agree to the order in which their names are listed in the byline. Footnotes regarding attribution of work (e.g., “X. Jones and Y. Smith contributed equally to . . .”) are not permitted. If necessary, such statements may be included in the Acknowledgments section.

A change in authorship (order of listing or addition or deletion of a name) after submission of the manuscript will be implemented only after receipt of signed statements of agreement from all parties involved. Disputes about authorship may delay review and/or publication of the manuscript.

Conflict of Interest

All authors are expected to disclose, in the manuscript submittal letter, any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted article.

(Inclusion of a company name in the author address lines of the manuscript does not constitute disclosure.) In addition, if a manuscript concerns a commercial product, the manufacturer’s name must be indicated at the first occurrence in both the abstract and the text.

Specifics of the disclosure will remain confidential. If appropriate, however, the editor may recommend that a *general* statement regarding the disclosure be included in the Acknowledgments section. All funding sources, institutional and corporate, should be credited in the Acknowledgments section, as described below.

Copyright

To maintain and protect the Society’s ownership and rights and to continue to afford scientists the opportunity to publish in high-quality journals, ASM requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all the authors. This agreement is sent to the corresponding author when the manuscript is accepted and scheduled for publication. Unless this agreement is executed (*without changes and/or addenda*), ASM will not publish the manuscript.

In the copyright transfer agreement signed by an author, ASM grants to that author (and coauthors) the right to republish *discrete portions* of his (their) article in any other publication (print, CD-ROM, and other electronic forms) of which he is (they are) the author(s) or editor(s), *on the condition that appropriate credit is given to the original ASM publication*. This republication right also extends to posting on a host computer to which there is access via the Internet. Except as indicated below, significant portions of the article may *not* be reprinted/posted without ASM’s prior written permission, however, as this would constitute duplicate publication.

Authors may post their own published articles on their *personal or university*, but not corporate, websites without ASM’s prior written permission provided that appropriate credit is given (i.e., either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version or “Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, page numbers, and year]” for the HTML version).

The copyright transfer agreement asks that authors who were U.S. Government employees and who wrote the article as part of their employment duties be identified. This is because works authored solely by such U.S. Government employees are not subject to copyright protection, so there is no copyright to be transferred. The other provisions of the copyright transfer agreement, such as author representations of originality and authority to enter into the agreement, apply to U.S. Government employee-authors as well as to other authors.

Use of Human Subjects or Animals in Research

The use of human subjects or other animals for research purposes is regulated by the federal government

and individual institutions. Manuscripts containing information related to human or animal use should clearly state that the research has complied with all relevant federal guidelines and institutional policies.

Patient Identification

To protect the privacy of individuals mentioned in clinical studies, in case histories, and as sources of isolates, do not identify them by their initials, even as part of a strain designation. Change the initials to numerals or use randomly chosen letters. Do not give hospital unit numbers; if a designation is needed, use only the last two digits of the unit. (Note: established designations of some viruses and cell lines, although they consist of initials, are acceptable [e.g., JC virus, BK virus, and HeLa cells].)

Nucleotide Sequences

It is expected that newly assigned GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for nucleotide and/or amino acid sequence data will be included in the original manuscript or be inserted when the manuscript is modified and that the data will be released to the public by the time the manuscript is published. The accession number should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Notes. If conclusions in a manuscript are based on the analysis of sequences and a GenBank/EMBL/DBJ accession number is not provided at the time of the review, authors may be required to provide the sequence data as a file on a floppy disk.

It is expected that when previously published sequence accession numbers are cited in a manuscript, the original citations (e.g., journal articles) will be included in the References section when possible or reasonable.

Authors are also expected to do elementary searches and comparisons of nucleotide and amino acid sequences against the sequences in standard databases (e.g., GenBank) immediately before manuscripts are submitted and again at the proof stage.

Database address information is as follows.

DBJ: Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan; telephone, 81-559-81-6853; fax, 81-559-81-6849; e-mail, ddbj@ddbj.nig.ac.jp (for data submissions); URL, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>.

EMBL: EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Hinxton, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom; telephone, 44-1223-494499; fax, 44-1223-494472; e-mail, datasubs@ebi.ac.uk; URL, <http://www.ebi.ac.uk>.

GenBank: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bldg. 38A, Rm. 8N-803, Bethesda, MD 20894; telephone, 301-496-2475;

fax, 301-480-9241; e-mail, info@ncbi.nlm.nih.gov; URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

See p. xiii for nucleic acid sequence formatting instructions.

Compliance

Failure to comply with the policies described above may result in a letter of reprimand, a suspension of publishing privileges in ASM journals, and/or notification of the authors' institutions.

Warranties and Exclusions

Articles published in this journal represent the opinions of the authors and do not necessarily represent the opinions of ASM. ASM does not warrant the fitness or suitability, for any purpose, of any methodology, kit, product, or device described or identified in an article. The use of trade names is for identification purposes only and does not constitute endorsement by ASM.

Page Charges

Authors whose research was supported by grants, special funds (including departmental and institutional), or contracts (including governmental) or whose research was done as part of their official duties are required to pay page charges. Page charges are currently \$30 per page for the first four pages and \$40 per page for each page in excess of four (subject to change without notice) for a corresponding author who is an ASM member, or \$35 per page for the first four pages and \$46 for each page in excess of four for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his member number on the reprint/page charge form. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the ASM membership application that is sent with the manuscript receipt letter and submit it and payment of the membership fee to ASM.

If the research was not supported by any of the means described above, a request to waive the charges may be sent to the Journals Department, ASM, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, with the submitted manuscript. This request, which should be separate from the cover letter, must indicate how the work was supported and should be accompanied by copies of the title page and Acknowledgments section.

Minireviews, Guest Commentaries, and regular Letters to the Editor are not subject to page charges. New-data Letters to the Editor and fast-track articles are subject to page charges.

Scope

The *Journal of Clinical Microbiology* (JCM) is devoted to the dissemination of new knowledge concerning the

microbiological aspects of human and animal infections and infestations, particularly their etiological agents, diagnosis, and epidemiology. **Case Reports will be considered if they are novel, add to existing knowledge, and are oriented toward microbiology.** (See p. ix for a description of the two different types of Case Report published.) Manuscripts which describe members of the “normal” human microbiota which become involved in disease production or complication and manuscripts dealing with the interactions of hospitalized patients and the microbial environment of the hospital may also be submitted for consideration.

ASM publishes a number of different journals covering various aspects of the field of microbiology. Each journal has a prescribed scope which must be considered in determining the most appropriate journal for each manuscript. The following guidelines may be of assistance.

(i) JCM will consider manuscripts (a) that describe the use of antimicrobial, antiparasitic, or anticancer agents as *tools* in the isolation, identification, or epidemiology of microorganisms associated with disease; (b) that are concerned with quality control procedures for diffusion, elution, or dilution tests for determining susceptibilities to antimicrobial agents in clinical laboratories; and (c) that deal with applications of commercially prepared tests or kits to assays performed in clinical laboratories to measure the activities of established antimicrobial agents or their concentrations in body fluids. Manuscripts on all other aspects of antimicrobial or antiparasitic agents, including reports concerned with development or modification of assay methods and validation of their sensitivity and specificity, will be considered for publication in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

(ii) JCM will consider manuscripts dealing with the isolation or identification of viral agents from humans and animals, with viral pathogenesis and immunity, and with the etiology and diagnosis of viral diseases. In addition, epidemiological studies of viral diseases or those involving the use of bacteriophages as a typing system or to identify bacteria will be considered. However, papers on the biology of phages and other viruses are more appropriate for the *Journal of Virology* or the *Journal of Bacteriology*.

(iii) Reports of clinical microbiology investigations or studies of the hospital population and the environment as they relate to nosocomial infections should be submitted to JCM. Manuscripts dealing with ecology or environmental studies or with the application of microorganisms to agricultural or industrial processes are more appropriate for *Applied and Environmental Microbiology*.

(iv) Papers involving immune response assessment and laboratory diagnostic aspects of immunologic diseases (e.g., autoimmune diseases and primary immunodeficiencies) are more appropriate for *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Manuscripts dealing with basic immunology or with mechanisms of pathogenicity are appropriate for *Infection and Immunity*.

(v) Manuscripts that describe detection of infectious agents by using already well described techniques (e.g., rtPCR, RAPID, PFGE, real-time PCR, etc.) will not be considered for publication unless application of the technique substantially improves the diagnostic process. It is expected that such manuscripts will compare sensitivity, specificity, and accuracy data with data obtained from more conventional methods using clinical specimens.

Questions about these guidelines may be directed to the editor in chief of the journal being considered.

If transfer to another ASM journal is recommended by an editor, the corresponding author will be contacted.

Note that a manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals.

Culture Deposition

JCM encourages authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

Links to Supplementary Material

Authors are encouraged to include the URLs of their websites if they contain data that might supplement those in the article itself and/or be of interest or assistance to readers. Such addresses should be included in the relevant text, not as footnotes.

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals and Books* (American Society for Microbiology, 2001, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 5th ed. (Oryx Press, 1998), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department. The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these instructions.

Review Process

All manuscripts are considered to be confidential and are reviewed by the editors, members of the editorial board, or qualified ad hoc reviewers. When a manuscript is submitted to the journal, it is given a number (e.g.,

JCM 47-02) and assigned to one of the editors. All coauthors are notified of this number and the editor to whom the manuscript has been assigned. (**Always refer to this number in communications with the editor and Journals Department.**) It is the responsibility of the corresponding author to inform the coauthors of the manuscript's status throughout the review and publication processes. The reviewers operate under strict guidelines set forth in "Guidelines for Reviewers" (www.journals.asm.org/misc/reviewguide.shtml) and are expected to complete their reviews expeditiously. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor's decision to accept, reject, or require modification. **Telephone inquiries concerning the status of a manuscript are discouraged.** There are occasions when the review process may require additional time. When a manuscript is returned to the corresponding author for modification, it should be returned to the editor within 2 months; otherwise, the manuscript may be considered withdrawn. A point-for-point response to the reviews must be included with the revised manuscript; an extra hard copy of the revised manuscript (without figures) should have the changes highlighted with a colored marker.

Manuscripts that have been rejected, or withdrawn after being returned for modification, may be resubmitted if the major criticisms have been addressed. As with initial submissions, resubmitted manuscripts should be sent to the Journals Department of ASM, *not to the editor*, and should be accompanied by a cover letter stating that the manuscript is a resubmission. A point-for-point response to the original reviews, as well as a copy of the resubmitted manuscript with the changes highlighted, should be included. Resubmitted manuscripts are normally handled by the original editor. Manuscripts cannot be resubmitted more than once unless permission has been obtained from the original editor or from the editor in chief.

NOTE: Manuscripts and illustrations are returned to the author at the discretion of the editor.

Manuscripts Submitted on Disk

Effective 1 January 2002, JCM will no longer publish manuscripts that are not provided on disks. Author-supplied disks will be used by the copy editor and the printer to generate proofs. Hard copy will, however, continue to be used for tables and for mathematical data set as display equations.

Although hard copy *only* must be supplied at the time of submission, a disk containing the revised version of the article **must** be sent to the editor at the **modification stage**. Because the disk undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type before being copyedited (see Notification of Acceptance, below), it is important that the article on disk be formatted correctly with all the proper sections and headings. **See Organization and Format, p. vi.** Double-spaced hard copy which **exactly** matches the file on disk **must** be supplied also. (For submission of illustrations on disk, see the section on computer-generated images on p. xi.)

We do not at present accept e-mailed files. Disks and CDs will **not** be returned. Failure to supply a disk at the modification stage will result in delayed publication. Please keep the following in mind:

- Do not use the compare feature in your word processing program to highlight changes in the revised version.
- Do not convert text to ASCII since this will result in loss of fonts and formatting that we want to preserve.
- Do not create symbols as graphics. Use the "insert symbol" function in your word processing program.
- Set page size to 8½ by 11 inches.
- Italicize or underline any words that should appear in italics.
- Include all section heads (see Organization and Format, p. vi), and indicate paragraph lead-ins in bold type.
- Label the disk clearly with the manuscript control number and the name of the file. Indicate whether it contains text only or both text and figures.
- Provide the name and version of the word processing software used (a wide range of applications is supported, but we *cannot* translate PDF or PostScript files or files created with BIBTEX; Chi-Writer; ClarisWorks 1.0; EG Word; Enable 4.0; Full Write version 2.0; Mathematica 3.0; Ready, Set, Go; or Scientific Writer 3.0), the operating system, the type of PC used (IBM compatible, Macintosh, or other), and the medium used to transmit files (see "Acceptable media" in the section on computer-generated images [p. xi]).

Notification of Acceptance

When an editor has decided that a manuscript is acceptable for publication on the basis of scientific merit, the hard copy and disk are sent to the Journals Department. The disk undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. If the disk has been prepared according to the criteria set forth in these instructions, this process will be completed successfully. If the disk fails, the author will be required to supply one that has been prepared correctly. Once a disk has been determined to be adequate, the manuscript is scheduled for the next available issue and an acceptance letter indicating the month of publication, approximate page proof dates, and table of contents section is mailed to the corresponding author. The editorial staff of the ASM Journals Department completes the editing of the manuscript to bring it into conformity with prescribed standards.

Page Proofs

Page proofs, together with a query sheet, a reprint order/page charge form, and instructions for handling

proofs, will be made available to the corresponding author electronically via a PDF file that can be accessed through a unique password. Since corresponding authors will be notified of the availability of their PDF proofs and assigned their unique password via e-mail, an e-mail address **must** be supplied in the correspondent footnote. Failure to do so may result in a delay in publication. **The PDF page proofs must be printed out, and corrections must be written on the hard copy.** Queries must be answered on the query page or on a separate sheet of paper, and any changes related to the queries must be indicated on the proofs. Note that the copy editor does not query at every instance where a change has been made. Queries are written only to request necessary information or clarification of an unclear passage or to draw attention to edits that may have altered the sense. It is the author's responsibility to read the entire text, tables, and figure legends, not just items queried. As soon as the page proofs are corrected and signed by the person who proofread them (within 48 h), they should be mailed or sent by a courier service such as FedEx, **not** faxed or sent as an e-mail attachment, to the ASM Journals Department.

The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions. Important new information that has become available between acceptance of the manuscript and receipt of the proofs may be inserted as an addendum in proof with the permission of the editor. If references to unpublished data or personal communications are added, it is expected that written assurance granting permission for the citation will be included. Limit changes to correction of spelling errors, incorrect data, and grammatical errors and updated information for references to articles that have been submitted or are in press. If URLs have been provided in the article, recheck the sites to ensure that the addresses are still accurate and the material that you expect the reader to find is indeed there.

Questions about *late proofs and problems in the proofs* should be directed to the ASM Journals Department (telephone, 202-942-9215). Questions about *accessing or viewing your PDF proofs* should be directed to Katie Gay of Cadmus Professional Communications at 804-261-3155 or gayk@cadmus.com.

Reprints

Reprints (in multiples of 100) may be purchased by all coauthors. An order form that includes a table showing the cost of reprints is sent with the proofs to the corresponding author.

PDF Files

A corresponding author who has included an e-mail address in his "corresponding author" footnote will have limited access (10 downloads, total) to the PDF file of his published article. An e-mail alert will automatically be sent to him on the day the issue is published. It will

provide a URL, which will be required to obtain access, and instructions. An article may be viewed, printed, or stored provided that it is for the author's own use.

Should coauthors or colleagues be interested in viewing the paper for their own use, the corresponding author may provide them with the URL; a copy of the article may not be forwarded electronically. However, they must be made aware of the terms and conditions of the ASM copyright. (For details, go to <http://www.journals.asm.org/misc/terms.shtml>.) Note that each such download will count toward the corresponding author's total of 10. After 10 downloads, access will be denied and can be obtained only through a subscription to the journal (either individual or institutional) or after the standard access control has been lifted (i.e., 6 months after publication).

ORGANIZATION AND FORMAT

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Full-Length Papers

Full-length papers include the elements described in this section.

Title, running title, and byline. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page include the title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), name of each author, address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address(es) of any author(s) no longer at the institution where the work was performed. Place an asterisk after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed and **give that author's telephone and fax numbers and e-mail address.**

Correspondent footnote. The complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication, and the e-mail address will be used to notify the corresponding author of availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. If these items are not provided on the manuscript title page, the ASM editorial staff will insert the information from the original letter of submission.

Abstract. Limit the abstract to **250 words or fewer** and concisely summarize the basic content of the paper with-

out presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Case Report. The Case Report section, placed after the introduction and before Materials and Methods, is optional and gives relevant clinical information about one or more patients while being incidental to the rest of the paper. (If the Case Report constitutes the entire article, the paper must be presented in Case Report format, which differs from that used for a full-length text or a Note [see p. ix].)

Materials and Methods. The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference or specifically recommended product or procedure is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." The reader should be allowed to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the sources and properties of the strains, mutants, bacteriophages, plasmids, etc.

A method, strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend.

Results. In the Results section, include the rationale

or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in **one** of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data which might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. All tabular data must be accompanied by either standard deviation values or standard errors of the means. The number of replicate determinations (or animals) used for making such calculations must also be included. All statements concerning the significance of the differences observed should be accompanied by probability values given in parentheses. The statistical procedure used should be stated in Materials and Methods. Limit illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand. It must not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: "This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute."

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph.

Appendixes. Appendixes, which contain supplementary material to aid the reader, are permitted. Titles, authors, and References sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length or Note style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References. (i) Works listed in References. The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, and published conference proceedings (not abstracts; see below), as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). All listed references **must** be cited in the text. Arrange the citations in **alphabetical order** (letter by letter, ignoring spaces and punctuation) by first author and **number consecutively**. Abbreviate journal names according to *BIOSIS Serial Sources* (BIOSIS, Philadelphia, Pa., 2002). Cite each listed reference by number in the text.

Follow the styles shown in the examples below.

Print references:

1. Arendsen, A. F., M. Q. Solimar, and S. W. Ragsdale. 1999. Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **181**:1489–1495.
2. Cox, C. S., B. R. Brown, and J. C. Smith. *J. Gen. Genet.*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
3. De Ley, J., M. Gillis, and J. Swings. 1984. Family VI. *Acetobacteraceae* Gillis and De Ley 1980, 23^{VP}, p. 267–278. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
4. Dunne, W. M., Jr., F. S. Nolte, and M. L. Wilson. 1997. Cumitech 1B, Blood cultures III. Coordinating ed., J. A. Hindler. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Fitzgerald, G., and D. Shaw. In A. E. Waters (ed.), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co., Boston, Mass.* {Chapter title is optional.}
6. Gershon, A. A., P. LaRussa, and S. P. Steinberg. 1999. Varicella-zoster virus, p. 900–911, In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Green, P. N., D. Hood, and C. S. Dow. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p. 251–254. In R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C1 compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Odell, J. C. April 1970. Process for batch culturing. U.S. patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/process if possible.}
9. O'Malley, D. R. 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles. {Title is optional.}

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., JCM 577-02) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online references:

1. Sullivan, C. J. (ed.). 1999–2001. Fungi: an evolving electronic resource for the microbiological community. ASM Press. [Online.] <http://link.asmsusa.de/link/service/books/91090>. Accessed 7 September 2001. {For online-only books.}
2. van der Zeiss, L., and V. B. Danziger. 1999. History of clinical microbiology. *Clin. Microbiol.* **100**:123–234. [Online.] {For online versions of print journals.}
3. Zellnitz, F., and P. M. Foley. 2 October 1998, posting {or revision} date. History of virology. *Am. Virol. J.* **1**:30–50. [Online.] <http://www.avj.html>. {For online-only journals; page numbers may not be available.}
4. Zheng, Z., and J. Zou. 5 September 2001. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol-3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M104749200. {For papers published online in manuscript form.}

(ii) Items cited in the text. References to unpublished data, articles submitted for publication, meeting abstracts, personal communications, letters and authors' replies to letters, company publications, patent applications and patents pending, databases, and websites should be made parenthetically in the text as follows.

... similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

... system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

... in mitochondria (S. De Wit, C. Thioux, and N. Clumeck, Abstr. 34th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 114, 1994).

... for other bacteria (A. X. Jones, personal communication.)

... discussed previously (L. B. Jensen, A. M. Hammerum, R. L. Poulsen, and H. Westh, Letter, Antimicrob. Agents Chemother. **43**:724–725, 1999).

... discussed previously (S. L. W. On and P. A. R. Vandamme, Authors' Reply to Letter, *J. Clin. Microbiol.* **39**:2751–2752, 2001).

... the manufacturer (Sigma manual, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

... this process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}

... information found at the XYZ website (http://cbx_iou.pgr).

... the ABC program (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.stu.micro>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may

NOT be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

Notes

Submit Notes in the same way as full-length papers. *They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.* The Note format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. However, Notes should contain firm data; observations alone are not acceptable.

Each Note must have an **abstract of no more than 50 words**. Do not use section headings in the body of the Note; report methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and if possible **should not exceed 1,000 words**; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. **Materials and methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes.** Acknowledgments should be presented as in full-length papers, but no separate heading is used. The References section is identical to that of full-length papers.

Minireviews

Minireviews are brief (**limit of 6 printed pages exclusive of references**) biographical profiles, historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas. They must be based on published articles; they may address any subject within the scope of the journal.

Minireviews may be either solicited or proffered by authors responding to a recognized need. Irrespective of origin, Minireviews are subject to editorial review, and three double-spaced copies of the manuscript should be sent directly to the ASM Journals Department. The cover letter should state whether the article was solicited and by whom.

Minireviews do not have abstracts. The body of the Minireview may either have section headings or be set up like a Note (see above).

Guest Commentaries

Guest Commentaries are *invited* communications concerning relevant topics in clinical microbiology that are not necessarily covered by Minireviews. They are intended to engender discussion and stimulate consensus statements by such organizations as the American Academy of Microbiology, National Committee for Clinical Laboratory Standards, etc. Reviews of the literature, methods and other how-to papers, and responses targeted at a specific published paper are not appropriate. Guest Commentaries are subject to editorial review.

The length may not exceed 4 printed pages. The format is like that of a Minireview (see above). Three double-spaced copies of the manuscript should be sent directly to the ASM Journals Department.

Case Reports

While a full-length article or a Note may contain a case report section when the report is incidental to the rest of the paper, a specific Case Report format must be used when the report constitutes the entire article.

A Case Report must include an abstract of no more than 50 words. The text starts with presentation of the case under the section heading "Case Report"; there is *no* introductory text before the Case Report heading. After the case is presented, the rest of the text follows in a separate section after a ruled line to separate the sections. No separate head is used for this short discussion section, but paragraph lead-ins are permitted. The total number of tables and figures (combined) must not exceed 3. For a recent example of a correctly formatted Case Report, see *J. Clin. Microbiol.* **39**:1678–1679, 2001.

Letters to the Editor

Two types of Letters to the Editor may be submitted. The first type is intended for comments on articles published previously in the journal and must cite published references to support the writer's argument. The second type may report new, concise findings that are not appropriate for publication as full-length papers or Notes.

Letters may be **no more than 500 words long and must be typed double spaced**. Refer to a recently published letter for correct formatting. Note that authors and affiliations are listed at the foot of the letter. Authors with the same affiliation must be listed together. The order of author names will be changed as necessary by the Journals staff to avoid repetition of an address.

For each type of letter, send three copies, along with a disk, to the Journals Department for processing. (Since letters are sometimes accepted without modification, a disk should be supplied at the submission stage to avoid a delay in publication.)

If the letter is related to a published article, it will be sent to the editor who handled the article in question. If the editor believes that publication is warranted, he will solicit a reply from the corresponding author of the article and give approval for publication.

If a letter consists of new findings, it will be assigned to an editor according to subject matter and will be reviewed by that editor and a reviewer.

Please note that some indexing/abstracting services may not include Letters to the Editor in their databases.

Errata

The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or printing (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. Send Errata directly to the Journals Department, both on disk and in hard copy (**only one hard copy is necessary**). **Please see a recent issue for correct formatting.**

Authors' Corrections

The Author's Correction section provides a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article.

For omission of an author's name, the authors of the article and the author whose name was inadvertently omitted must agree, in writing, to publication of the correction. Copies of the agreement letters must accompany the correction and be sent directly to the Journals Department. Send the correction both on disk and in hard copy (**only one hard copy is necessary**). **Please see a recent issue for correct formatting.**

Corrections of a scientific nature (e.g., an incorrect unit of measurement or order of magnitude used throughout; contamination of one of numerous cultures; or misidentification of a mutant strain, causing erroneous data for only a portion [noncritical] of the study) must be sent, both on disk and in hard copy, directly to the editor who handled the article and must be accompanied by signed letters of agreement from all of the authors of the article. If the editor believes that publication is warranted, he will send the correction to the Journals Department for publication. Note that the addition of new data is not permitted.

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Send a Retraction and an accompanying explanatory letter *signed by all of the authors* directly to the editor in chief of the journal. The editor who handled the paper and the chairman of the ASM Publications Board will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the Journals Department for publication.

Disclaimers

Statements disclaiming governmental or any other type of endorsement or approval will be deleted by the Journals Department.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

The figure number and authors' names should be written on all figures, either in the margin or on the back (marked lightly with a soft pencil). For micrographs especially, the top should be indicated as well. Do **not** include the figure number in any lettering or labeling applied to the figure. This information belongs in the legend and in any case may need to be changed before the article is published.

Do not cite references by number in camera-ready copy; the numbering may change when the manuscript is copyedited.

Do not clasp figures to each other or to the manuscript with paper clips. Insert small figures in an envelope. To avoid damage in transit, do not submit illustrations larger than 8½ by 11 inches.

Illustrations in published articles will not be returned to authors.

Continuous-Tone and Composite Illustrations

When submitting continuous-tone photographs (e.g., polyacrylamide gels), keep in mind the journal page width: 3⅝ inches for a single column and 6⅞ inches for a double column (maximum). Include only the significant portion of an illustration. Photos must be of sufficient contrast to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. **Submit one photograph of each continuous-tone figure for each copy of the manuscript; photocopies are not acceptable.** If possible, the figures submitted should be the size they will appear when published so that no reduction is necessary. If they must be reduced, make sure that *all* elements, including labeling, can withstand reduction and remain legible.

If a figure is a composite of a continuous-tone photograph and a drawing or labeling, the **original composite** (i.e., not a photograph of the composite) **must be provided** for the printer. This original, labeled "printer's copy," may be sent with the modified manuscript to the editor. Composites should be mounted on lightweight flexible backing, not on heavy cardboard.

Electron and light micrographs must be direct copies of the original negative. Indicate the magnification with a scale marker on each micrograph.

Color Photographs and Illustrations

Because the process of placing ink on paper by using printing presses is different from that used to produce a photo print or a laser print, some differences in color and contrast between the photo you submit and the photo printed in the journal will be evident. (Figures showing red or green fluorescence and those with a significant range of colors may be difficult or impossible to reproduce exactly.) To help our printer minimize the differences and produce an image of the highest possible quality, please identify on a photocopy of your color figure any areas where fine detail or a good color match is particularly important. Explain what must be evident on the figure; e.g., circle a group of cells and say "Individual cells (red spots) must be clearly differentiated in here." **Include this marked photocopy when sending the revised version of the manuscript to the editor at the modification stage.**

The cost of printing in color must be borne by the author. Adherence to the following guidelines will help to minimize costs and to ensure color reproduction that is as accurate as possible.

Keep in mind the journal page width (3⅝ inches for a single column and 6⅞ inches for a double column) and

height (9 $\frac{1}{16}$ inches) and submit figures at the size they should appear when published so that no reduction is necessary. Include only the significant portions of illustrations so that the number of printed pages containing color figures is minimized. Make sure that all edges are straight and corners are square. To reduce the cost, mount separate panels together as a composite “plate” when possible and add any necessary labels and tooling (i.e., thin white lines between the parts) that is of even width. Composites should be mounted on lightweight flexible backing so that they can be wrapped around a scanner drum. (If a composite is mounted on a heavy board and cannot be wrapped on the drum, a transparency will have to be produced, at additional cost.)

For optimal color reproduction, plates should comprise parts containing similar colors of similar lightness or darkness. If necessary, separate unlike photos on a single plate into two separate plates; this will increase the cost, but the color rendition will be more accurate since the two plates will be scanned separately.

See also “Computer-Generated Images” below.

Computer-Generated Images

We encourage authors to submit figures digitally if possible. The use of digital files results in a better final product than does the use of hard-copy printouts. Images produced by authors’ desktop systems are digitized and printed as patterns of dots. This presents problems for the reproduction of such prints in the journal because the printing process also requires that the images be broken up into a dot pattern. Performing this process twice results in degradation of image quality and resolution. It is possible to use prints produced by desktop systems, but they will have to be scanned slightly out of focus to avoid interference of the dot patterns, and thus ASM cannot guarantee the quality of their reproduction. It is preferable either to replace these images with continuous-tone photographs of the figures in question, which can be scanned normally and will produce high-quality printed photographs, or to submit illustrations electronically. *Should you be interested in electronic submission of art, please read the instructions provided below and those posted on the Internet at <http://cjs.cadmus.com/da>.*

At the time of submission, submit **only** hard-copy printouts of each figure. With the revised manuscript, submit **both** a hard copy of each figure and a disk. The disk must be labeled clearly with the manuscript control number and the name(s) of the file(s). Indicate whether the disk contains only figures or both text and figures. **Failure to clearly label the disk will result in a delay of publication.** The hard copy **MUST** match the figure on the disk *exactly* (both content and size). Failure to submit hard copy or submission of a copy that does not match the disk version exactly will result in a delay of publication. The type of software used and the number of images stored must be indicated on each disk.

Currently, ASM will accept digital art created only with a graphics program listed below:

Macintosh

Adobe Illustrator 6.0, 7.0, 8.0, 9.0
 Adobe Photoshop 4.0, 5.0, 5.0 LE,* 5.5, 6.0
 Adobe InDesign 1.0
 Deneba Canvas 5.0, 6.0, 7.0
 Macromedia FreeHand 7.0, 8.0, 9.0
 QuarkXPress 3.32
 Synergy Kaleidagraph 3.08, 3.5, 3.51*
 ClarisDraw 1.0*
 CA CricketGraph III 1.5.3*
 CorelDRAW 6.0, 8.0
 Adobe PageMaker 6.5
 Corel Photo-Paint 8.0
 ChemDraw Pro 5.0
 PowerPoint 98, 2001
 Prism 3 by GraphPad*

Windows

Adobe Photoshop 4.0, 5.0, 5.0 LE,* 5.5, 6.0
 Adobe InDesign 1.0
 Macromedia FreeHand 7.0, 8.0, 9.0
 QuarkXPress 3.32
 Adobe Illustrator 7.0, 8.0, 9.0
 CorelDRAW 7.0, 8.0, 9.0
 Adobe PageMaker 6.5
 Deneba Canvas 6.0, 7.0
 Corel Photo-Paint 8.0, 9.0
 ChemDraw Pro 5.0
 PowerPoint 97, 2000, XP
 Prism 3 by GraphPad*

*ASM accepts only black-and-white, not color, graphics created with Kaleidagraph, ClarisDraw, Adobe Photoshop 5.0 LE, Prism 3, and CricketGraph.

Images produced with other types of software will NOT be accepted; ASM will instead use the hard copy submitted with the disk.

See below for information on saving the figures, media, compression, resolution, and size:

Saving the figures

Black-and-white graphics: TIFF or EPS†
 Color graphics: EPS in CMYK mode‡

†Exception: black-and-white graphics created with Adobe InDesign 1.0 or CricketGraph must be saved as EPS files. For PowerPoint, refer to Cadmus’s digital art website at <http://cjs.cadmus.com/da>.

‡Exception: color graphics created with Adobe Photoshop or ChemDraw Pro may be saved as CMYK TIFF files. Do not save color graphics in RGB. For PowerPoint, refer to Cadmus’s digital art website at <http://cjs.cadmus.com/da>.

Acceptable media

3.5-inch floppy disks (formatted for Macintosh or Windows)

44-, 88-, or 200-MB SyQuest disks (formatted for Macintosh)

650-MB magneto-optical disks (formatted for Macintosh)

Imega Zip disks (formatted for Macintosh or Windows)

CD-ROM (formatted for Macintosh or Windows)

Imega Jaz disks (formatted for Macintosh or Windows)

Imation Super Disk 120MB (formatted for Macintosh)

(Note that disks and CD-ROMs will not be returned to the author.)

Acceptable compression

PKZIP or WINZIP for Windows

Stuffit for Macintosh

Any self-extracting compression software

Please indicate on the disk whether the file is compressed.

Minimum resolution

300 dpi for gray scale and color

600 dpi for the lettering

1,200 dpi for line art

Size

All graphics **MUST** be submitted at their **actual size**; that is, they should be 100% of their print dimensions so that no scaling is necessary.

Maximum width for a 1-column figure: $3\frac{5}{16}$ inches

Maximum width for a 2-column figure: $6\frac{7}{8}$ inches

Minimum width for a 2-column figure: $4\frac{1}{8}$ inches

Maximum depth: $9\frac{1}{16}$ inches

Make sure that any multipanel figures are assembled into one file; i.e., rather than sending a separate file for each panel in a figure, assemble all panels in one piece and supply them as one file.

Label and lock the disk. Never send the only copy of a file. All final lettering, labeling, tooling, etc., **MUST** be incorporated into the final supplied figures. It cannot be added at a later date. **Do not** include the figure number in the image. To avoid font problems, set all type in Helvetica, Times New Roman, European PI, Mathematical PI, or Symbol. All fonts must be Type 1 PostScript. All type set in illustration programs should be converted to paths or outlines to ensure the quality of the type without requiring that any fonts be sent. **Do NOT** use complex paths, areas that require trapping, or RGB files.

If you require further information, please send an e-mail inquiry to digitalart@cadmus.com. Inquiries will be answered within 48 h, during normal business hours.

Since the contents of computer-generated images can be manipulated for better clarity, the Publications Board at its May 1992 meeting indicated that a description of the software/hardware used should be indicated in the figure legend(s).

Drawings

Submit graphs, charts, complicated chemical or mathematical formulas, diagrams, and other drawings as glossy photographs made from finished drawings not requiring additional artwork or typesetting. Computer-generated graphics produced on high-quality laser printers are also usually acceptable. No part of the graph or drawing should be handwritten. Both axes of a graph must be labeled.

When creating line art, please use the following guidelines:

1. Submit the art as close to its final size as possible. Most graphs can be reduced to one-column width ($3\frac{5}{16}$ inches). If the art is larger than it will appear in the journal, *all* elements in the figure should be large enough to withstand reduction.

2. Avoid using screens in line art. It can be difficult and time-consuming to reproduce these images without moiré patterns. Various pattern backgrounds are preferable to screens.

3. If you must provide an image that has screens in it:

- Submit the image at its final size. Generate the image at line screens of 85 lines per inch or lower.
- When applying multiple shades of gray, differentiate the gray levels by at least 20%.
- Never use levels of gray below 20% or above 70% as they will fade out or become totally black upon scanning and reduction.

4. Use thick, solid lines that are no finer than 1 point in thickness.

5. No type should be smaller than 9 point at the final reduced size.

6. Avoid layering type directly over shading or textured areas.

7. Avoid the use of reversed type (white lettering on a black background).

8. Avoid heavy letters, which tend to close up, and unusual symbols, which the printer may not be able to reproduce in the legend.

In figure ordinate and abscissa scales (as well as table column headings), avoid ambiguous use of numbers with exponents. Usually, it is preferable to use the appropriate Système International d'Unités (SI) symbols (μ for 10^{-6} , m for 10^{-3} , k for 10^3 , M for 10^6 , etc.). A complete listing of SI symbols can be found in the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) "Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units" (Pure Appl. Chem. **21**:3-44, 1970). Thus, a representation of 20,000 cpm on a figure ordinate should be made by the number 20 accompanied by the label kcpm.

When powers of 10 must be used, the journal requires

that the exponent power be associated with the number shown. In representing 20,000 cells per ml, the numeral of the ordinate would be “2” and the label would be “ 10^4 cells per ml” (not “cells per ml $\times 10^{-4}$ ”). Likewise, an enzyme activity of 0.06 U/ml would be shown as 6 accompanied by the label 10^{-2} U/ml. The preferred designation would be 60 mU/ml (milliunits per milliliter).

Presentation of Nucleic Acid Sequences

Nucleic acid sequences of limited length which are the primary subject of a study may be presented freestyle in the most effective format. Longer nucleic acid sequences must be presented in the following format to conserve space. Submit the sequence as camera-ready copy with dimensions of 8½ by 11 inches (or slightly less) in standard (portrait) orientation. Print the sequence in lines of 100 bases, each in a nonproportional (monospace) font which is easily legible when published at 100 bases/6 inches. Uppercase and lowercase letters may be used to designate the exon-intron structure, transcribed regions, etc., if the lowercase letters remain legible at 100 bases/6 inches. Number the sequence line by line; place numerals, representing the first base of each line, to the left of the lines. **Minimize spacing between lines of sequence, leaving room only for annotation of the sequence.** Annotation may include boldface, underlining, brackets, boxes, etc. Encoded amino acid sequences may be presented, if necessary, immediately above or below the first nucleotide of each codon, by using the single-letter amino acid symbols. Comparisons of multiple nucleic acid sequences should conform as nearly as possible to the same format.

Figure Legends

Legends should provide enough information so that the figure is understandable without frequent reference to the text. However, detailed experimental methods must be described in the Materials and Methods section, not in a figure legend. A method that is unique to one of several experiments may be reported in a legend only if the discussion is very brief (one or two sentences). Define all symbols used in the figure and define all abbreviations that are not used in the text.

Tables

Type each table on a separate page. Arrange the data so that **columns of like material read down, not across**. The headings should be sufficiently clear so that the meaning of the data is understandable without reference to the text. See the Abbreviations section of these instructions for those that should be used in tables. Explanatory footnotes are acceptable, but more extensive table “legends” are not. Footnotes should not include detailed descriptions of the experiment. Tables must include enough information to warrant table format;

those with fewer than six pieces of data will be incorporated into the text by the copy editor. Table 1 is an example of a well-constructed table.

Tables that can be photographically reproduced for publication without further typesetting or artwork are referred to as “camera ready.” They should not be hand lettered and must be carefully prepared to conform to the style of the journal. The advantage of submitting camera-ready copy is that the material will appear exactly as envisioned by the author and no second proof-reading is necessary. This is particularly advantageous when there are long, complicated tables and when the division of material and spacing are important.

TABLE 1. Correlation between detection of V-Z viral antibody by neutralization and by EIA and IAHA^a

Antibody	No. of samples with V-Z virus-neutralizing antibody		Correlation (%)
	Positive ^b	Negative	
EIA			
Positive	50	4	94
Negative	3	64	
IAHA			
Positive ^c	37	0	87
Negative	16	68	

^a Sera from individuals without evidence of a current V-Z virus infection.

^b Titer > 1:4.

^c Titer > 1:8.

NOMENCLATURE

Chemical and Biochemical Nomenclature

The recognized authority for the names of chemical compounds is *Chemical Abstracts* (Chemical Abstract Service, Ohio State University, Columbus) and its indexes. *The Merck Index*, 12th ed. (CRC Press LLC, Boca Raton, Fla., 1996), is also an excellent source. For biochemical terminology, including abbreviations and symbols, consult *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (1978; reprinted for The Biochemical Society, London, England) and the instructions to authors of the *Journal of Biological Chemistry* and the *Archives of Biochemistry and Biophysics* (first issues of each year).

Do not express molecular weight in daltons; molecular weight is a unitless ratio. Molecular mass is expressed in daltons.

For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) as described in *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., New York, N.Y., 1992). If a nonrecommended name is used, place the proper (trivial) name in parentheses at first use in the abstract and text. Use the EC number when one has been assigned, and express enzyme activity either in katal (preferred) or in the older system of micromoles per minute.

Drugs

Whenever possible, use generic names of drugs; the use of trade names is not permitted.

Nomenclature of Microorganisms

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), must be used for all microorganisms. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *E. coli*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all taxa (phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics and should be underlined (or italicized) in the manuscript; strain designations and numbers are not. Vernacular (common) names should be in lowercase roman type (e.g., streptococcus, brucella). For *Salmonella*, genus, species, and subspecies names should be rendered in standard form: *Salmonella enterica* at first use, *S. enterica* thereafter; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* at first use, *S. enterica* subsp. *arizonae* thereafter. Names of serovars should be in roman type with the first letter capitalized: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. After the first use, the serovar may also be given without a species name: *Salmonella* serovar Typhimurium. For other information regarding serovar designations, see *Identification and Serotyping of Salmonella and an Update of the Kaufmann-White Scheme* (A. C. McWhorter-Murlin and F. W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) and *Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars* (M. Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France, 1997).

The spelling of bacterial names should follow the *Approved Lists of Bacterial Names* (amended edition) (V. B. D. Skerman, V. McGowan, and P. H. A. Sneath, ed., American Society for Microbiology, 1989) and the validation lists published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (formerly the *International Journal of Systematic Bacteriology*) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Bacterial Nomenclature Up to Date (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>) and List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr>). If there is reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text.

It is recommended that a strain be deposited in a recognized culture collection when that strain is necessary for the description of a new taxon (see *Bacteriological Code*, 1990 Revision, American Society for Microbiology, 1992).

Since the classification of fungi is not complete, it is

the responsibility of the author to determine the accepted binomial for a given organism. Sources for these names include *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th ed. (C. P. Kurtzman and J. W. Fell, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1998), and *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, Including the Lichens*, 7th ed. (Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1983).

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and published in *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (M. H. V. van Regenmortel et al., ed., Academic Press, San Diego, Calif., 2000). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, like other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*). When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Microorganisms, viruses, and plasmids should be given designations consisting of letters and serial numbers. It is generally advisable to include a worker's initials or a descriptive symbol of locale, laboratory, etc., in the designation. Each new strain, mutant, isolate, or derivative should be given a new (serial) designation. This designation should be distinct from those of the genotype and phenotype, and italicized genotypic and phenotypic symbols should not be included. Plasmids are named with a lowercase "p" followed by the designation in uppercase letters and numbers. To avoid the use of the same designation as that of a widely used strain or plasmid, check the designation against a publication database such as Medline.

Genetic Nomenclature

To facilitate accurate communication, it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body. Review and/or publication of submitted manuscripts that contain new or nonstandard nomenclature may be delayed by the editor or the Journals Department so that they may be reviewed by the Nomenclature Committee of the ASM Publications Board.

Before submission of manuscripts, authors may direct questions on genetic nomenclature to the committee's chairman, D. P. Nierlich (e-mail, donn@microbio.ucla.edu; fax, 310-206-5231). Such a consultation should be mentioned in the final manuscript submission letter to ASM.

Bacteria. The genetic properties of bacteria are de-

scribed in terms of phenotypes and genotypes. The phenotype describes the observable properties of an organism. The genotype refers to the genetic constitution of an organism, usually in reference to some standard wild type. Use the recommendations of Demerec et al. (*Genetics* **54**:61–64, 1966) as a guide to the use of these terms. If your manuscript contains information including genetic nomenclature, please refer to the Instructions to Authors in the January issue of the *Journal of Bacteriology*.

“Mutant” vs. “mutation.” Keep in mind the distinction between a *mutation* (an alteration of the primary sequence of the genetic material) and a *mutant* (a strain carrying one or more mutations). One may speak about the mapping of a mutation, but one cannot map a mutant. Likewise, a mutant has no genetic locus, only a phenotype.

Tetracycline resistance determinants. The nomenclature for tetracycline resistance determinants is based on the proposal of Levy et al. (*Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1523–1524, 1999). The style for such determinants is, e.g., Tet B; the space helps distinguish the determinant designation from that for phenotypes and proteins (TetB). The above-referenced article also gives the correct format for genes, proteins, and determinants in this family.

Viruses. The genetic nomenclature for viruses differs from that for bacteria. In most instances, viruses have no phenotype, since they have no metabolism outside host cells. Therefore, distinctions between phenotype and genotype cannot be made. Superscripts are used to indicate hybrid genomes. Genetic symbols may be one, two, or three letters.

ABBREVIATIONS AND CONVENTIONS

Verb Tense

ASM strongly recommends that for clarity you use the **past** tense to narrate particular events in the past, including the procedures, observations, and data of the study that you are reporting. Use the present tense for your own general conclusions, the conclusions of previous researchers, and generally accepted facts. Thus, most of the abstract, Materials and Methods, and Results will be in the past tense, and most of the introduction and some of the Discussion will be in the present tense.

Be aware that it may be necessary to vary the tense in a single sentence. For example, it is correct to say “White (30) demonstrated that XYZ cells *grow* at pH 6.8,” “Figure 2 shows that ABC cells failed to grow at room temperature,” and “Air *was* removed from the chamber and the mice *died*, which *proves* that mice *require* air.” In reporting statistics and calculations, it is correct to say “The values for the ABC cells *are* statistically significant, indicating that the drug *inhibited*. . .”

For an in-depth discussion of tense in scientific writing, see p. 207–209 in *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 5th ed.

Abbreviations

General. Abbreviations should be used as an aid to the reader, rather than as a convenience for the author, and therefore their **use should be limited**. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 1978) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g., “the drug” or “the substrate”). Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, Leu, etc.) may also be used.

It is strongly recommended that all abbreviations except those listed below be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., “Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM).” Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Not requiring introduction. In addition to abbreviations for Système International d’Unités (SI) units of measurement, other common units (e.g., bp, kb, and Da), and chemical symbols for the elements, the following should be used without definition in the title, abstract, text, figure legends, and tables: DNA (deoxyribonucleic acid); cDNA (complementary DNA); RNA (ribonucleic acid); cRNA (complementary RNA); RNase (ribonuclease); DNase (deoxyribonuclease); rRNA (ribosomal RNA); mRNA (messenger RNA); tRNA (transfer RNA); AMP, ADP, ATP, dAMP, ddATP, GTP, etc. (for the respective 5′ phosphates of adenosine and other nucleosides) (add 2′-, 3′-, or 5′- when needed for contrast); ATPase, dGTPase, etc. (adenosine triphosphatase, deoxyguanosine triphosphatase, etc.); NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized); NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced); NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced); NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized); poly(A), poly(dT), etc. (polyadenylic acid, polydeoxythymidylic acid, etc.); oligo(dT), etc. (oligodeoxythymidylic acid, etc.); UV (ultraviolet); PFU (plaque-forming units); CFU (colony-forming units); MIC (minimal inhibitory concentration); Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]; DEAE (diethylaminoethyl); EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); EGTA [ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid]; HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid); PCR (polymerase chain reaction); and AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Abbreviations for cell lines (e.g., HeLa) also need not be defined.

The following abbreviations should be used without definition in tables:

amt (amount)	SE (standard error)
approx (approximately)	SEM (standard error of the mean)
avg (average)	

concn (concentration)	sp act (specific activity)
diam (diameter)	sp gr (specific gravity)
expt (experiment)	temp (temperature)
exptl (experimental)	tr (trace)
ht (height)	vol (volume)
mo (month)	vs (versus)
mol wt (molecular weight)	wk (week)
no. (number)	wt (weight)
prepn (preparation)	yr (year)
SD (standard deviation)	

Drugs. Should an author decide to abbreviate the names of antimicrobial agents in a manuscript, the following standard abbreviations are recommended.

Antibacterial agents. Amikacin, AMK; amoxicillin, AMX; amoxicillin-clavulanic acid, AMC; ampicillin, AMP; ampicillin-sulbactam, SAM; azithromycin, AZM; azlocillin, AZL; aztreonam, ATM; carbenicillin, CAR; cefaclor, CEC; cefadroxil, CFR; cefamandole, FAM; cefazolin, CFZ; cefdinir, CDR; cefditoren, CDN; cefepime, FEP; cefetamet, FET; cefixime, CFM; cefmetazole, CMZ; cefonicid, CID; cefoperazone, CFP; cefotaxime, CTX; cefoteten, CTT; cefoxitin, FOX; cefpodoxime, CPD; cefprozil, CPR; ceftazidime, CAZ; ceftibuten, CTB; ceftizoxime, ZOX; ceftriaxone, CRO; cefuroxime (axetil) and cefuroxime (sodium), CXM; cephalixin, LEX; cephalothin, CEF; cephalirin, HAP; cephradine, RAD; chloramphenicol, CHL; cinoxacin, CIN; ciprofloxacin, CIP; clarithromycin, CLR; clinafloxacin, CLX; clindamycin, CLI; daptomycin, DAP; dicloxacillin, DCX; dirithromycin, DTM; doxycycline, DOX; enoxacin, ENX; erythromycin, ERY; fleroxacin, FLE; fosfomycin, FOF; gatifloxacin, GAT; gentamicin, GEN; grepafloxacin, GRX; imipenem, IPM; kanamycin, KAN; levofloxacin, LVX; linezolid, LZD; lomefloxacin, LOM; loracarbef, LOR; meropenem, MEM; methicillin, MET; mezlocillin, MEZ; minocycline, MIN; moxalactam, MOX; moxifloxacin, MXF; nafcillin, NAF; nalidixic acid, NAL; netilmicin, NET; nitrofurantoin, NIT; norfloxacin, NOR; ofloxacin, OFX; oxacillin, OXA; penicillin, PEN; piperacillin, PIP; piperacillin-tazobactam, TZP; quinupristin-dalfopristin (Synercid), Q-D; rifabutin, RFB; rifampin, RIF; rifapentine, RFP; sparfloxacin, SPX; spectinomycin, SPT; streptomycin, STR; teicoplanin, TEC; telithromycin, TEL; tetracycline, TET; ticarcillin, TIC; ticarcillin-clavulanic acid, TIM; tobramycin, TOB; trimethoprim, TMP; trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT; trovafloxacin, TVA; and vancomycin, VAN.

β -Lactamase inhibitors. Clavulanic acid, CLA; sulbactam, SUL; and tazobactam, TZB.

Antifungal agents. Amphotericin B, AMB; clotrimazole, CLT; flucytosine, 5FC; fluconazole, FLC; itraconazole, ITC; ketoconazole, KTC; nystatin, NYT; terbenfine, TRB; and voriconazole, VRC.

Antiviral agents. Acyclovir, ACV; cidofovir, CDV; famciclovir, FCV; foscarnet, FOS; ganciclovir, GCV; penciclovir, PCV; and valaciclovir, VCV.

Reporting Numerical Data

Standard metric units are used for reporting length, weight, and volume. For these units and for molarity, use the prefixes m, μ , n, and p for 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , and 10^{-12} , respectively. Likewise, use the prefix k for 10^3 . Avoid compound prefixes such as m μ or $\mu\mu$. Use $\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ in place of the ambiguous ppm. Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K.

When fractions are used to express units such as enzymatic activities, it is preferable to use whole units, such as “g” or “min,” in the denominator instead of fractional or multiple units, such as μg or 10 min. For example, “pmol/min” is preferable to “nmol/10 min,” and “ $\mu\text{mol/g}$ ” is preferable to “nmol/ μg .” It is also preferable that an unambiguous form such as exponential notation be used; for example, “ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ” is preferable to “ $\mu\text{mol/g/min}$.” Always report numerical data in the appropriate SI unit.

Representation of data as accurate to more than two significant figures must be justified by presentation of appropriate statistical analyses.

Isotopically Labeled Compounds

For simple molecules, labeling is indicated in the chemical formula (e.g., $^{14}\text{CO}_2$, $^3\text{H}_2\text{O}$, and $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$). Brackets are not used when the isotopic symbol is attached to the name of a compound that in its natural state does not contain the element (e.g., ^{32}S -ATP) or to a word that is not a specific chemical name (e.g., ^{131}I -labeled protein, ^{14}C -amino acids, and ^3H -ligands).

For specific chemicals, the symbol for the isotope introduced is placed in square brackets directly preceding the part of the name that describes the labeled entity. Note that configuration symbols and modifiers precede the isotopic symbol. The following examples illustrate correct usage:

$[^{14}\text{C}]$ urea	UDP- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ glucose
L- $[methyl\text{-}^{14}\text{C}]$ methionine	<i>E. coli</i> $[^{32}\text{P}]$ DNA
$[2,3\text{-}^3\text{H}]$ serine	fructose 1,6- $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ bisphosphate
$[\alpha\text{-}^{14}\text{C}]$ lysine	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP

This journal follows the same conventions for isotopic labeling as the *Journal of Biological Chemistry*, and more detailed information can be found in the instructions to authors of that journal (first issue of each year).