



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

**Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas  
durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe,  
Pernambuco, Brasil**

MORSE EDSON PESSOA JÚNIOR

RECIFE  
2006

MORSE EDSON PESSOA JÚNIOR

**Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas  
durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe,  
Pernambuco, Brasil**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Concentração Microbiologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-orientadora:

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal

RECIFE

2006

**Pessoa Júnior, Morse Edson**

**Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil / Morse Edson Pessoa Júnior. – Recife : O Autor, 2006.**

**66 folhas. il., fig.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Microbiologia, 2006.**

**Inclui bibliografia.**

**1. *Yersinia pestis*    2. VNTRs    3. MLVA    I. Título.**

**573**

**CDU (2.ed.)**

**UFPE**

**570**

**CDD (22.ed.)**

**CCB 061**

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL MESTRADO, DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e seis, às catorze horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de Dissertação apresentada pelo Mestrando **Morse Edson Pessoa Júnior**, intitulada: "**Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil**". A Banca Examinadora foi homologada em seis de julho de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Alzira Maria Paiva de Almeida** (Orientadora), Doutora em Microbiologia pela Universidade de Paris, França, **Manuela Figueiroa Lyra de Freitas**, Doutora em Nutrição, pela Universidade Federal de Pernambuco **Marise Sobreira Bezerra da Silva**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Maria José de Souza Lopes** Doutora em Citogenética Animal, pela Universidade de São Paulo e **Nilma Cintra Leal**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, suplentes. A Profª. Nilma Leal co-orientadora deu início à Sessão, para apresentação de defesa de Dissertação do Mestrado. Agradeceu a presença de todos e passou a palavra ao Mestrando que efetuou a apresentação de sua tese durante vinte e cinco minutos. Continuando, a Profª. Nilma Leal solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.ª Marise Bezerra da Silva (1º examinador); Dr.ª Manuela de Freitas (2º examinador), Dr.ª Nilma Leal (3º examinador), em substituição ao titular. A presidenta fez agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim proceder a avaliação. A Banca Examinadora atribuiu a **Morse Edson Pessoa Júnior** a seguinte menção:

"**Aprovado**" por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a colar grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Microbiologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco.

Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 31 de julho de 2006.

*Nilma Cintra Leal, Manuela F. L. de Freitas,  
Marise Sobreira Bezerra da Silva, Maria José de Souza Lopes,  
Morse Edson Pessoa, Ana Gláucia A. Bruno, Maristela A. Vilela,  
Adenilda A. Lima,*

*“Até aqui nos ajudou o Senhor”*

*I Samuel 7:12*

*Aos meus amados pais, Edson e Marly, pelo apoio, amor e incentivo, sem os quais eu não conseguiria.*

*Dedico.*

# Sumário

Agradecimentos.....	V
Lista de figuras.....	VII
Lista de tabela.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
Resumo.....	X
Abstract.....	XI
Introdução.....	12
Justificativa.....	15
Objetivos.....	17
Revisão da Literatura.....	19
Histórico da Peste.....	20
Situação atual da peste no Brasil e no Mundo.....	21
Epidemiologia da Peste.....	21
Agente Etiológico da Peste.....	23
Diagnóstico .....	24
Diagnóstico Bacteriológico.....	24
Diagnóstico Sorológico.....	25
Diagnóstico Molecular.....	25
Prevenção e Controle.....	25
Tratamento.....	26
Genoma da <i>Yersinia pestis</i> .....	26
Métodos de Tipagem.....	28
Referências Bibliográficas.....	31
Artigo: Estudo de cepas de <i>Yersinia pestis</i> isoladas durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil.....	37
Conclusões.....	56
Anexos.....	58

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, porque me deu força e vontade de vencer.*

*Em especial aos meus amados pais, a minha irmã Flávia, e a todos os meus familiares, pela força, incentivo e constante estímulo.*

*Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ e em especial ao Departamento de Microbiologia, pela utilização de equipamentos e instalações.*

*À Coordenação do Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas (UFPE), em especial a Profa. Suely Lins Galdino, pelo eficiente trabalho. E as secretárias Adenilda Eugênia e Liane Salomé pelo apoio.*

*A orientadora, Dra. Alzira Almeida, por seu apoio, paciência, dedicação e competência, que foi de suma importância para a realização deste trabalho.*

*A Dra. Nilma Cintra Leal, pelo apoio, incentivo, dedicação, que foram muito importantes na realização deste trabalho.*

*A Dra. Tereza Cristina, por sua grande contribuição.*

*A Dra. Maria Betânia de Melo, por sua valiosa contribuição neste trabalho.*

*A Dra. Marise Sobreira, por sua grande contribuição.*

*A Silvana Santos, por sua valiosa contribuição neste trabalho e por seu incentivo.*

*A Isaac Martnis e Yara Nakasawa, pelo eficiente apoio técnico.*

*Aos colegas do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ, em especial a Cariri, Rodrigo Menezes, Tâmara, Éden, Christian, Ana Paula, Camyla, Soraya, Joseane, Wagner, Fabiana, Lucas, Franklin Magalhães, Franklin Bispo, Gerlane, Karina, Mirele, Thiers, Pollyana, Daniele, Mariana Marques, Mariana Palma, Wladimir, Wellington, Marília, Alexandra, Isabelle, Patrícia, Paloma, e a todos que me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho, pela colaboração ajuda e amizade.*

*A todos os colegas de turma do mestrado, em especial a Giuliana Viegas, Juliana Luna, Jaciana Aguiar, Jadilma, Messias, Adriana e Clebson, pelo convívio e amizade ao longo do curso.*

*A todos os colegas do Pentágono, pelo constante apoio e incentivo.*

## Lista de Figuras

Figura 1	Gel de agarose 2% representativo da Ribotipagem-PCR de culturas de <i>Y. pestis</i> .....	51
Figura 2	Gel de agarose 2% representativo da Ribotipagem-PCR, colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de <i>Y. pestis</i> .....	52
Figura 3	Gel de agarose 1% representativo dos produtos das amplificações, por Multiplex-PCR, dos genes de virulência <i>pla</i> , <i>lcrv</i> , <i>caf1</i> <i>irp2</i> nas culturas de <i>Y. pestis</i> .....	53
Figura 4	Gel de agarose 2,5 % representativo das amplificações por PCR, dos VNTRs das culturas de <i>Y. pestis</i> com os <i>primers</i> : 1AB, ms46, M58, M37 e M34.....	54
Figura 5	Gel de agarose 2,5 % representativo das amplificações por PCR com os <i>primers</i> ms06 e colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de <i>Y. pestis</i> .....	55

## Lista de tabelas

Tabela 1	Características dos isolados de <i>Yersinia pestis</i> , segundo a data de isolamento, procedência, perfis de virulência e VNTR.....	49
Tabela 2	Primers utilizados na amplificação dos genes de virulência da <i>Yersinia pestis</i> .....	50
Tabela 3	Características dos VNTRs analisados em cepas de <i>Yersinia pestis</i> .....	50

## Lista de abreviaturas

BAB	-Blood Agar Base
BHI	-Brain Heart infusion
CPqAM	-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	-Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	-Desoxirribonucleotídeo trifosfato
FUNASA	-Fundação Nacional de Saúde
HA	-Hemaglutinação
HPI	-Ilha de Patogenicidade
IS	-Seqüência de Inserção
MLVA	-Análise de VNTR
NPCRTbU	Nested de PCR Tudo Único
pb	-Pares de base
PCR	-Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	-Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH	-Potencial de hidrogênio
PPP	-Plano Piloto de Peste em Exu
RAPD	-Polimorfismo do DNA Amplificado Randomico
RDC	-República Democrática do Congo
RFLP	-Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
rRNA	-RNA Ribossomal
RSI	-Regulamento Sanitário Internacional
SRP	-Serviço de Referencia em Peste
STE	-SDS 2,5%, Tris-HCl 10mM, EDTA 0,25M
TBE	-Tris-HCl, ácido bórico, EDTA
TE	-Tris-HCl 1mM; EDTA 10mM
UV	-Ultra Violeta
VNTR	-Número Variável de Repetições em Tandem

## Resumo

A *Yersinia pestis*, bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, é uma espécie muito homogênea quando observada pelos métodos fenotípicos: apresenta apenas um sorotipo, um fagotipo e um biotipo subdividido em três biovars ou variedades geográficas. A peste é uma doença primária dos roedores, geralmente transmitida por pulgas e que ocasionalmente pode infectar outros mamíferos, inclusive o homem, que é atingido acidentalmente ao penetrar no ecossistema da doença. Ela ainda persiste nos dias atuais entre diversos hospedeiros/reservatórios em numerosos focos silvestres em vários países do mundo e atualmente é considerada uma doença reemergente. Devido à alta taxa de letalidade e ao seu potencial de epidemização, a peste é classificada como doença de notificação Classe I de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) vigente, o que exige vigilância permanente dos focos, sobretudo porque a *Y. pestis* pode ser usada como agente de bioterrorismo. A vigilância da peste no Brasil baseia-se na pesquisa da bactéria em roedores e pulgas e de anticorpos antipestosos em animais sentinela (algumas espécies de roedores resistentes à infecção e carnívoros domésticos, como os cães e gatos). O conhecimento das características dos isolados de cada foco permitirá detectar a introdução de uma nova cepa e, conseqüentemente, a sua origem, se de outro foco ou por ato deliberado. Os estudos de tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* por diferentes técnicas, como a RAPD-PCR, PCR-ribotipagem e RFLP-IS100, revelaram, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre as cepas, independentemente das fontes, procedência e ano. Recentemente, um estudo utilizando MLVA (análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem), mostrou que as cepas de *Y. pestis* do Brasil apresentavam polimorfismo. Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Y. pestis* em um mesmo evento epidemiológico através de locos VNTR (número variável de repetições em tandem). Um conjunto de vinte cepas de *Y. pestis* isoladas durante a investigação de uma epizootia em um foco da Chapada do Araripe, município de Exu, Pernambuco, Brasil, em agosto de 1967, foi analisado. As cepas conservadas na bacterioteca do SRP (Serviço de Referência em Peste) foram reativadas e a identificação bacteriológica confirmada pela suscetibilidade ao bacteriófago antipestoso. Alterações no genoma foram pesquisadas pela presença ou ausência de genes de virulência nos plasmídeos prototípicos da *Y. pestis* e na Ilha de Patogenicidade (HPI) das yersínias, através da multiplex-PCR. Foram analisados seis locos VNTR pela reação de PCR. A ausência de alguns genes de virulência foi evidenciada em dez cepas, sugerindo que modificações genômicas ocorreram nesses isolados. Apesar disso, dos seis VNTR analisados cinco se revelaram monomórficos e apenas um apresentou polimorfismo, gerando três alelos. Colônias morfologicamente diferentes, grandes e pequenas, em algumas cepas, apresentaram padrão VNTR atípico, com duas bandas amplificadas. Por MLVA as cepas revelaram-se geneticamente relacionadas, o que reflete a relação epidemiológica desses isolados. Ao mesmo tempo, é necessário a análise de um maior número de VNTRs para confirmar a relação genética dessas cepas, em comparação com cepas de outros focos.

Palavras chave: *Yersinia pestis*, VNTRs, MLVA

## Abstract

The *Yersinia pestis*, Gram-negative bacterium of the Enterobacteriaceae family, is a very homogeneous species when observed for the phenotypic methods: it presents only one serotype, one phage type and one biotype subdivided in three biovars or geographic varieties. The plague is a primary illness of the rodents, generally transmitted for fleas and that occasionally it can infect other mammals, also the man, who is reached accidentally when penetrating in the ecosystem of the illness. It still persists in the current days between diverse hosts/reservoirs in numerous wild focus in some countries of the world and currently an illness is considered reemergence. Due to high tax of lethality and to its potential of epidemization, the plague is classified as notification illness Class I in accordance with Regulation Sanitaria International (RSI) effective, what it demands permanent monitoring of the focus, over all because the *Y. pestis* can be used as bioterrorism agent. The monitoring of the plague in Brazil is based on the research of the bacterium in rodents and fleas and of antipestos antibodies in animals sentry (some domestic species of resistant rodents to the infection and carnivores, as the dogs and cats). The knowledge of the characteristics of the isolated ones of each focus will allow to detect the introduction of new strain e, consequently, its origin, if of another focus or for deliberate act. The studies of molecular typing of strains Brazilian of *Y. pestis* for different techniques, as RAPD-PCR, PCR-ribotyping and RFLP-IS100, had disclosed, most of the time, identical genomic standards between strains, independently of the sources, origin and year. Recently, a study using MLVA (analysis of loci multiples of the changeable number of repetitions in tandem), it showed that strains of *Y. pestis* of Brazil presented polymorphism. This work had as objective to characterize isolated of *Y. pestis* in one same event epidemiologist through loci VNTR (changeable number of repetitions in tandem). A set of twenty strains of *Y. pestis* isolated during the inquiry of an epizootic in a focus of the Chapada of the Araripe, city of Exu, Pernambuco, Brazil, in August of 1967, was analyzed. Strains conserved in the bacteriotecca of the SRP (Service of Reference in Plague) had been reactivated and the bacteriological identification confirmed by the susceptibility to the antipestoso bacteriophage. Alterations in the genome had been searched by the presence or absence of genes of virulence in *Y. pestis* the prototypic plasmids of the and in the Island of Pathogenicity (HPI) of the yersinias, through the multiplex-PCR. Six loci VNTR for the PCR reaction had been analyzed. The absence of some genes of virulence was evidenced in ten strains, suggesting that genomic modifications had occurred in these isolated ones. Although this, of six analyzed VNTR five if had disclosed monomorphic and only one presented polymorphism, generating three alleles. Different, great and morphologically small colonies, in some strains, had presented atypical standard VNTR, with two amplified bands. For MLVA strains had shown related genetically, what it reflects the relation epidemiologist of these isolated ones. At the same time, the analysis of a bigger number of VNTRs to confirm the genetic relation of these is necessary strains, in comparison with strains of other focus.

Words key: *Yersinia pestis*, VNTRs, MLVA

## **INTRODUÇÃO**

A peste, infecção pela *Yersinia pestis*, é uma doença primária dos roedores geralmente transmitida por pulgas e que ocasionalmente pode infectar outros mamíferos, inclusive o homem, que é atingido acidentalmente ao penetrar no ecossistema da doença. Equivocadamente, a população e mesmo profissionais de saúde a consideram doença do passado, já extinta, mas ela ainda persiste nos dias atuais entre diversos hospedeiros/reservatórios em numerosos focos silvestres em vários países do mundo e atualmente é considerada uma doença reemergente. Devido à alta taxa de letalidade e ao seu potencial de epidemização, a peste é classificada como doença de notificação Classe I de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) vigente, o que exige vigilância permanente dos focos.

A peste foi introduzida no Brasil no decorrer da última pandemia, em 1899, pelo porto de Santos-SP, focalizando-se principalmente no Nordeste, tornando-se um agravo de interesse regional. Os focos brasileiros atualmente estão localizados nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e no Rio de Janeiro, um foco isolado na serra dos Órgãos.

A vigilância da peste no Brasil baseia-se na pesquisa da bactéria em roedores e pulgas e de anticorpos antipestosos em animais sentinela (algumas espécies de roedores resistentes à infecção e carnívoros domésticos, como os cães e gatos). A partir de 1966, com o Plano Piloto de Peste em Exu, Pernambuco (PPP), as atividades de vigilância e controle da peste se expandiram por todo o Brasil e permitiram a obtenção de 917 cepas de *Y. pestis* oriundas de roedores, pulgas e humanos, nos diferentes focos de peste no Nordeste brasileiro, com o último espécime sendo isolado em 1997 e que são conservadas na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM).

A reemergência da peste em alguns países (Índia, Equador e Argélia), a ocorrência de epidemias como a da República Democrática do Congo (RDC) e a possibilidade de uso da *Y. pestis* como arma biológica em ações terroristas renovaram o interesse sobre o estudo do bacilo e o desenvolvimento de técnicas que possibilitem determinar a origem e rastreamento de cepas. O conhecimento das características dos isolados de cada foco

---

permitirá detectar a introdução de uma nova cepa e, conseqüentemente, a sua origem, se de outro foco ou por ato deliberado.

Os estudos de tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* por diferentes técnicas, como a RAPD-PCR, Ribotipagem-PCR e RFLP-IS100, demonstraram um baixo poder discriminatório, revelando, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre as cepas, independentemente das fontes, procedência e ano do isolamento. Recentemente, uma análise por MLVA (Análise de Múltiplos Locos do número Variável de repetições em tandem ou em seqüência), conseguiu demonstrar polimorfismo nas cepas brasileiras.

A proposta desse trabalho é caracterizar isolados de *Y. pestis* obtidos de roedores e pulgas durante uma epizootia ocorrida em 1967 em Exu-PE, no foco da Chapada do Araripe, através da MLVA de vários locos VNTR, para estabelecer a relação clonal de bacilos obtidos durante um mesmo evento epidemiológico, e dessa forma identificar um marcador para estudos epidemiológicos.

## **JUSTIFICATIVA**

O Programa de vigilância da peste exige o conhecimento das características das cepas isoladas no diversos focos existentes no Brasil, assim é importante encontrar marcadores moleculares que permitam o rastreamento de novas cepas introduzidas no País.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO**

- Caracterizar isolados de *Yersinia pestis* obtidos durante um mesmo evento epidemiológico através da análise da variação de múltiplos locos (MLVA).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a presença de fatores de virulência.
- Observar a relação entre os padrões genômicos das cepas.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

## Histórico da Peste

A peste é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Y. pestis*, conhecida desde a antiguidade, constando registros já no Antigo Testamento, no II Livro de Samuel, provavelmente originada no Planalto Central Asiático. Através dos séculos diversas pandemias devastaram as populações humanas. Durante a era Cristã foram registradas três grandes pandemias. A primeira pandemia, denominada Peste de Justiniano devastou o mundo civilizado entre 542 a 602 d.C. A segunda pandemia, conhecida como Peste Negra, novamente dizimou as populações, matando 25 milhões de pessoas apenas na Europa, durante o século XIV. A terceira pandemia ou Pandemia Contemporânea iniciou-se na China em 1894 e de Hong Kong dispersou-se por todo o mundo. Os pesquisadores empenharam-se na elucidação dos caracteres epidemiológicos da peste e em 1884 Alexander Yersin isolou o bacilo pestoso, dois anos mais tarde Roux definiu o papel do rato e um ano após Simond, reconheceu o papel da pulga na transmissão da peste (Perry & Fetherston 1997).

A peste chegou ao Brasil em outubro de 1899, através do porto de Santos, no Estado de São Paulo, trazida pelos ratos e pulgas do navio Zeyer, procedente de Roterdã, durante a terceira pandemia. Logo em seguida, a doença difundiu-se para várias outras cidades litorâneas, atingindo Recife, Pernambuco em 1902. A partir de 1906, a peste dispersou-se através de rotas comerciais terrestres e fluviais e instalou-se entre os roedores silvestres em áreas rurais, principalmente nas regiões Nordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e na região Sudeste: norte de Minas Gerais, Rio de Janeiro (Serra dos Órgãos), onde as condições ecológicas, e a presença de roedores reservatórios permitiram a sobrevivência do bacilo (WHO/PHO 1965; Almeida et al. 1985).

---

## Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo

Na última década graves epidemias de peste foram registradas na África principalmente em Madagascar, Moçambique, Uganda e Tanzânia e recentemente na RDC (República Democrática do Congo). Casos esporádicos têm ocorrido em vários países das Américas (EUA, Peru, Brasil e Bolívia), na Ásia Central (Uzbequistão, Turkmênistão e Kazakhstão), China, Mongólia e Vietnã. Depois de décadas de silêncio a peste reemergiu na Índia, Argélia e Equador (Bertherat 2006).

No Brasil há duas áreas principais de focos independentes, os do Nordeste e o da Serra dos Órgãos. Os focos do Nordeste produziam até meados da década de 1980 de 20 a 100 casos anualmente, principalmente os dos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. A partir de então, houve um decréscimo substancial no registro dos casos de peste. Os últimos registros de peste humana ocorreram nos Estados do Ceará e Paraíba nos anos 80. Durante a última década, alguns casos humanos suspeitos, clínica e epidemiologicamente ainda foram notificados no Ceará e na Bahia. Contudo, somente três deles, ocorridos no Ceará, foram confirmados, dois por exame sorológico, em Guaraciaba do Norte, e um por isolamento da bactéria, em Ipu (Almeida et al. 2005). O último registro de peste humana ocorreu no estado do Ceará, em fevereiro de 2005 (Almeida et al. 2005) o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos.

Em Minas Gerais e no Rio de Janeiro não há notificação de casos humanos há décadas e é raro encontrar anticorpos antipestosos nos animais sentinela (FUNASA 2002). O foco da Serra dos Órgãos resume-se a cinco surtos de curta duração, com o último ocorrendo em 1967, com oito casos humanos e duas mortes (Coura et al. 1967; Almeida et al. 2005).

## Epidemiologia da Peste

A peste é uma doença infecciosa primariamente de roedores e a transmissão ocorre principalmente através das picadas de pulgas infectadas. O homem é infectado acidentalmente, quando em contato com roedores ou outros animais e suas pulgas (Perry &

---

Fetherston 1997). A peste humana apresenta-se sob três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica. A peste bubônica é a mais comum no Brasil. Esta forma caracteriza-se pela tumefação dos linfonodos superficiais (bubões) principalmente os localizados nas regiões axilar, inguino-crucal e cervical. A sintomatologia da forma bubônica é febre alta, dor de cabeça, calafrios e dores generalizadas. O doente ainda pode apresentar manifestações intestinais tais como náuseas, vômitos e diarréias (FUNASA 2002).

A peste septicêmica geralmente aparece na fase terminal da peste bubônica não tratada. Geralmente não há reações ganglionares visíveis e o bacilo pode ser detectado no sangue. Os sintomas são: febre, dor de cabeça, mal estar e distúrbios gastrointestinais. Essa forma tem alta letalidade (30 a 50%) quando não tratada. A peste pneumônica é a forma mais grave da doença, devido ao seu quadro clínico, sua alta letalidade e seu alto potencial de contágio, podendo provocar epidemias. Tem início com um quadro infeccioso grave de evolução rápida, com abrupta elevação térmica, calafrios, arritmia, hipotensão, náuseas, vômitos e perturbação mental, com sinais e sintomas pulmonares discretos ou ausentes. Se não tratada precocemente, surgem o delírio e coma, e o quadro evolui para a morte (FUNASA 2002).

Estima-se que no mundo haja cerca de 200 espécies de roedores envolvidos no ciclo epidemiológico da peste. Nos focos do Nordeste do Brasil, os principais roedores envolvidos no ciclo da peste pertencem aos gêneros: *Bolomys*, *Calomys*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Galea*, *Trychomys* e *Rattus*. Alguns, como os *Galea* (preás) e ratos (*R. rattus*), são pouco suscetíveis à doença, enquanto outros, como os *Bolomys*, são muito sensíveis, passíveis de grande mortandade nas epizootias, ampliando e difundindo a infecção (Karimi et al. 1978; FUNASA 2002).

Os lagomorfos (coelhos e lebres), alguns marsupiais (timbú, cassaco) e insetívoros (porco-espinho e musaranho), carnívoros selvagens e domésticos (raposas, cães e gatos) assim como os camelos e macacos, podem contrair a peste. As aves são refratárias à infecção, mas podem participar eventualmente do ciclo carreando pulgas para outras regiões e infestando outros roedores (Perry & Fetherston 1997).

---

Os animais de estimação, por seu contato íntimo com o homem e a sua condição de predadores (cães e gatos), podem carrear pulgas infectadas pela *Y. pestis*, bem como desenvolver a infecção. Os cães habitualmente não expressam manifestações clínicas, mas os gatos podem apresentar as formas ganglionar, faríngea e a pneumônica, o que os torna extremamente perigosos, pois podem determinar casos de peste pneumônica em humanos. Os cães e gatos que sobrevivem carregam os anticorpos específicos até durante um ano (Perry & Fetherston 1997).

Das 1.200 espécies de pulgas conhecidas, 55 são encontradas no Brasil e as espécies *Polygenis bohlsi jordani* e *P. tripus* são os principais vetores da peste entre os roedores. A *Xenopsylla cheopis* e *Pulex irritans* também participam da transmissão. A *Polygenis ssp.*, quando infectada, transmite a peste entre os roedores e pode ser encontrada, embora em pequeno número, no vestuário ou livres nas moradias (FUNASA 2002).

A transmissão inter-humana pode ocorrer por aerossóis na forma pneumônica, por acidentes com tecidos e materiais em trabalhos de campo ou no laboratório ou ainda na utilização da bactéria como agente de uma guerra biológica (Perry & Fetherston 1997; Inglesby et al. 2000).

### **Agente Etiológico da Peste**

O agente causador da peste, a *Y. pestis* é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae. O gênero *Yersinia* é composto de 11 espécies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. mollareti*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. rodhei* e *Y. ruckeri*. Além da *Y. pestis*, as espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* também são patogênicas para o homem e animais. A *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são enteropatogênicas, transmitidas pela via oral-fecal e provocam um quadro clínico denominado yersiniose. A *Y. kristensenii* pode ser enteropatogênica para o homem e a *Y. ruckeri* é um patógeno de peixe (Perry & Fetherston 1997).

A *Y. pestis* é uma espécie muito homogênea, possuindo apenas um sorotipo, um fagotipo e três biovar ou variedades geográficas, definidos pela capacidade das culturas em

---

fermentar o glicerol e reduzir nitratos a nitritos: Antiqua ou Continental (glicerol<sup>+</sup>, nitrato<sup>+</sup>), maedievalis (glicerol<sup>+</sup>, nitrato<sup>-</sup>) e Orientalis ou Oceânica (glicerol<sup>-</sup>, nitrato<sup>+</sup>). Cada variedade foi associada à cepa responsável por uma das pandemias do passado (Perry & Fetherston 1997). A ribotipagem de cepas dos diversos focos do mundo confirmou esta associação com as variedades geográficas (Guiyoule et al. 1994).

### **Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial é realizado por técnicas bacteriológicas (identificação e isolamento da bactéria) ou sorológicas (detecção de anticorpos antipestosos) e mais recentemente por técnicas moleculares. Para análise bacteriológica podem ser utilizadas amostras de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica no homem, além de sangue e vísceras de roedores e macerados de pulgas. O diagnóstico sorológico é realizado em soro humano, de roedores e de outros mamíferos. O diagnóstico molecular consiste na identificação de genes plasmidiais e/ou cromossomais da *Y. pestis* (Chu 2000).

### **Diagnóstico Bacteriológico**

#### **Exame Direto**

As técnicas utilizadas para o diagnóstico bacteriológico por exame direto são a coloração pelo azul de metileno (Azul de Löffler), o corante de Wayson ou o método de Gram. As análises são realizadas utilizando esfregaços de aspirado de bubão, amostras de sangue, medula e vísceras dos roedores e macerados de pulgas. Os bacilos de *Y. pestis* se apresentam alongados com extremidades coradas mais intensamente no formato de grânulos (Chu 2000).

---

## **Cultura**

Para identificação da *Y. pestis* as amostras são cultivadas em duas placas de base para Agar sangue (Blood Agar Base = BAB, Difco) a 28°C em pH na faixa de 7,4 a 7,6 por 48 a 72 horas. Depois do semeio adiciona-se uma gota do fago antipestoso específico em uma das placas. As colônias apresentam tamanho pequeno, forma convexa, aspecto brilhante-translúcido e bordas inteiras. No ponto da cultura onde foi colocado o bacteriófago forma-se uma área de lise das colônias (Karimi 1978).

## **Diagnóstico Sorológico**

A técnica de hemaglutinação (HA) é a mais utilizada. Essa técnica utiliza hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno capsular F1 da *Y. pestis* para detecção de anticorpos em soros humanos, de roedores e de carnívoros (Chu 2000).

## **Diagnóstico Molecular**

É uma opção na qual se identificam genes de virulência presentes nos plasmídios prototípicos e cromossoma da *Y. pestis* do DNA ou diretamente de pulgas e material de humanos e roedores. No SRP/CPqAM foram padronizados várias técnicas baseadas na PCR para identificação de genes de virulência presentes nos plasmídeos prototípicos da *Y. pestis* e no seu cromossomo: Nested-PCR (Leal et al. 1996), Multiplex-PCR (Leal & Almeida 1999) e NPCRTbU (Souza, 2005).

## **Prevenção e Controle**

A vigilância nos focos é realizada através da pesquisa da *Y. pestis* nos roedores e suas pulgas e na detecção de anticorpos antipestosos circulantes em animais sentinelas e o controle é realizado pela eliminação das pulgas com inseticidas apropriados, pela

---

desratização e a antiratização, que consiste da destruição de abrigos e alimentação para os roedores, nas áreas endêmicas de peste (FUNASA 2002).

### **Tratamento**

O uso de antimicrobianos eficazes reduz significativamente a mortalidade, mesmo nas formas pneumônica e septicêmica, desde que os pacientes sejam tratados precocemente. Os antibióticos de escolha para o tratamento da peste são os aminoglicosídeos, as tetraciclina e as sulfas. O antibiótico de referência é a estreptomicina. A gentamicina vem sendo utilizada cada vez mais frequentemente, assim como a doxiciclina. As fluoroquinolonas estão sendo estudadas e também são eficazes no tratamento da doença (FUNASA 2002).

### **Genoma da *Y. pestis***

O genoma completo de cinco cepas (CO92, KIM, 91001, Antiqua e Nepal 516) já foi sequenciado e as cepas típicas possuem um cromossomo e três plasmídeos prototípicos (pYV, pPst e pFra). Alguns plasmídeos de resistência a antibióticos e plasmídeos crípticos foram encontrados em cepas de alguns focos (Parkhill et al. 2001; Deng et al. 2002; Song et al. 2004; Chain et al. 2006).

O plasmídeo pYV (70 kb) está presente nas outras espécies de *Yersinia* patogênicas e é indispensável à virulência das cepas. Este plasmídeo contém uma região de dependência ao cálcio (*lcrV*) para crescimento a 37°C. Fora dessa região estão localizados vários genes que codificam para um sistema de secreção tipo III (TTSS) que permitem a sobrevivência e multiplicação das bactérias nos tecidos linfóides dos hospedeiros (Cornelis 2000).

O plasmídeo pPst (9,5 kb) é específico da *Y. pestis* e parece ser responsável pelas proteínas implicadas no bloqueio do trato digestivo das pulgas e na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro a partir do sítio da picada (Hinnebush et al. 1996; Hinnebush 2003), mas cepas de roedores no foco do Cáucaso não possuem este plasmídeo (Filippov et al. 1990). No pPst estão localizados os genes *pst*, que codificam para uma pesticina, *pim*, que codifica para uma proteína de imunidade, a pesticina, e o *pla* que

---

codifica para uma coagulase e uma fibrinolisinase ou ativador do plasminogênio. A pesticina é uma bacteriocina produzida pela *Y. pestis* ativa contra outras bactérias (*Y. pseudotuberculosis* do sorogrupo I, *Y. enterocolitica* do sorogrupo O:8, algumas cepas de *E. coli* e cepas de *Y. pestis* que não possuem o pPst), mas não contra a própria espécie, pois produz uma proteína de imunidade (Pim) contra sua própria pesticina (Sodeinde & Gouguen 1988; Sodeinde et al. 1988). A coagulase se expressa a temperaturas inferiores a 30°C no organismo das pulgas, favorecendo a permanência do bacilo no trato digestivo do vetor, e a fibrinolisinase ou ativador do plasminogênio, acima dessa temperatura no organismo do hospedeiro mamífero, favorecendo a disseminação da bactéria a partir do ponto da picada (Perry & Fetherston 1997).

O plamídeo pFra (90-110 kb) codifica uma proteína capsular ou fração F1 que desempenha uma atividade antifagocítica (Du et al. 2002) e a toxina murina, Ymt, que parece estar envolvida na transmissão da peste pelas pulgas (Hinnebush 2002). A F1 é imunogênica para o homem e outros mamíferos e é largamente utilizada nos testes de diagnóstico da peste seja pela pesquisa de anticorpos anti-F1 ou pela identificação do gene estrutural da F1, *caf I* (Chu 2000).

No cromossomo da *Y. pestis* foi identificada uma grande região (loco *pgm*) composta de dois segmentos que são física e funcionalmente distintos, denominados: segmento de aquisição do ferro e segmento de pigmentação. O loco *pgm* é instável e pode ser deletada em bloco ou por segmento, resultando em alterações na virulência das culturas (Fetherston et al. 1992). No segmento de aquisição do ferro encontram-se genes envolvidos na síntese do sideróforo das yersínias (yersniabactina). Esta região é considerada uma ilha de patogenicidade ou HPI (high pathogenicity island) das yersínias (Carniel 2001). Um segmento é responsável pela captação de ferro, loco *pgm*, e o outro segmento da pigmentação está associado a capacidade das bactérias estocarem o heme ou substâncias homólogas, como o corante vermelho-Congo nos meios de cultura desenvolvendo colônias pigmentadas. As culturas pigmentadas (vermelho) são virulentas e as não pigmentadas (brancas) são avirulentas (Carniel 2001). O segmento da pigmentação parece ter importância na transmissão da *Y. pestis* pelas pulgas (Fetherston et al. 1992; Carniel 2001).

---

No genoma da *Y. pestis* são encontradas múltiplas cópias de seqüências de inserção (IS) integradas no cromossomo e/ou nos plasmídeos. As IS são pequenos segmentos de DNA bacteriano (<2,5 Kb) capazes de se transportar dentro do genoma bacteriano, causando inserções, deleções e recombinações, resultando em mutações, inativação de genes, bloqueio ou inativação do controle da expressão gênica (Mahillon & Chandler 1998). O pFra possui duas cópias do elemento de inserção IS-100, uma do IS-200 e uma do IS-285, o pYV possui múltiplas cópias dos elementos IS100 e IS 285 e o pPst apenas uma cópia do elemento IS100 (Filippov et al. 1995; Simonet et al. 1996; Lindler et al. 1998; Huang et al. 2002; Motin et al. 2002).

O sequenciamento de genomas bacterianos revelou um alto percentual de DNA que consiste de repetições de seqüências de bases em múltiplas cópias denominadas VNTRs. Essas seqüências variam em tamanho, localização, complexidade e modo de repetição, são estáveis e polimórficas e podem estar agrupadas ou dispersas no genoma. Dependendo da localização das VNTRs no genoma bacteriano podem ocorrer alterações acarretando perda de funções gênicas, o que repercutirá na patogenicidade da bactéria e na adaptação do patógeno ao hospedeiro (Lindstedt 2005).

### **Métodos de Tipagem**

A epidemiologia molecular baseia-se na identificação e comparação da estrutura genética dos isolados bacterianos permitindo estabelecer correlação entre eles. Atualmente, existem numerosos métodos de tipagem, na sua maioria baseados na PCR e suas variações, com diferentes capacidades discriminatórias (Tenover et al.1995).

A ribotipagem baseada no padrão de restrição dos genes do rRNA (Grimont & Grimont 1986), apresenta limitações por ser uma técnica laboriosa, uso de material radioativo e demanda de longo tempo de execução. A PCR-ribotipagem é mais rápida, pode ser realizada diretamente da colônia bacteriana, dispensando a extração do DNA, utiliza primers desenhados para amplificar regiões espaçadoras entre os genes 16S-23S do rDNA (Kostman et al. 1992).

---

O RAPD ou amplificação aleatória de DNA polimórfico é relativamente simples, pois não necessita conhecimento prévio da seqüência da bactéria e mostra o perfil do genoma todo incluindo seqüências plasmidiais. No entanto, é uma técnica de difícil reprodutibilidade, sofrendo interferência da qualidade e quantidade do DNA, da marca e até do lote da enzima, variação de modelo do termociclador (Meunier & Grimont, 1993). Apesar disso, estudos de RAPD com *Y. pestis* do Brasil revelaram um padrão homogêneo para as cepas de diversos focos (Leal 1998).

A RFLP, análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, baseia-se na separação de fragmentos de DNA, obtidos por digestão com endonucleases de restrição. Se os fragmentos apresentarem tamanho pequeno podem ser analisados através de sondas de DNA direcionadas a regiões específicas do genoma que podem fornecer perfis característicos de determinados microorganismos. Essas sondas podem identificar genes de virulência ou regiões como seqüências de inserção (IS), que em *Y. pestis* são encontradas dispersas por todo o cromossomo ou nos plasmídeos. Essas seqüências favorecem rearranjos cromossômicos e integração de plasmídeos, no entanto são consideradas regiões estáveis e podem ser utilizadas como marcador para tipagem. Se os fragmentos forem muitos grandes devem ser analisadas pela técnica do PFGE (Huang et al. 2002).

O PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) baseia-se na separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão com endonucleases de restrição que reconhecem seqüências raras e cortam o DNA em grandes fragmentos, os quais são analisados através da migração em gel submetido a pulsos em direções alternadas (Den Dunnen & Van Ommen 1992).

Os VNTRs ou regiões repetitivas sofrem freqüentemente mutações resultando, na maioria das vezes, em alterações no número de repetições. Essas mutações ocorrem durante a replicação do DNA e podem surgir em combinação com falhas durante o mecanismo de reparo (Strand et al. 1993)

A análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem amplificados pela reação em cadeia da polimerase (MLVA) utilizando *primers* específicos que flanqueiam regiões repetitivas do genoma (VNTRs), permitem detectar variações genômicas entre cepas intimamente relacionadas de várias bactérias patogênicas e auxiliam

---

em estudos epidemiológicos na identificação de fontes de infecção (Van Belkum et al. 1998; Lindstedt 2005; Oliveira 2006).

Quanto ao tamanho os VNTRs, podem ser classificados como mini ou microsátélites. Os microsátélites correspondem a unidades repetidas que variam de 1 a 5 pares de base. Em bactérias, os microsátélites são também chamados de locos de contigência de seqüências simples (Bayliss et al. 2001). Os minissátélites, por outro lado, correspondem a unidades repetidas de mais de seis pares base. Esses VNTRs podem ser encontrados em tandem ou dispersos no genoma (Jeffreys et al. 1985). Nas bactérias a quantidade de repeats em tandem varia significativamente entre os genomas. As análises das seqüências dos genomas de *Y. pestis* e *Bacillus anthracis* revelaram uma densidade média de 30 Mb de repeats em tandem considerado um valor relativamente alto quando comparado aos outros genomas bacterianos (LeFlèche et al. 2001).

Em *Y. pestis*, o estudo da variação no número de *repeats* de alguns locos VNTRs auxiliou nos estudos de tipagem (Adair et al. 2000; LeFlèche et al. 2001; Klevytska et al. 2001) e epidemiologia molecular dessa espécie, permitindo identificar os clones circulantes em uma determinada área geográfica (Girard et al. 2004; Lowell et al. 2005).

No Brasil, estudos de tipagem molecular utilizando diferentes técnicas: RAPD-PCR (Leal 1998), PCR-ribotipagem (Sobreira 2002), RFLP-IS100 (Silva 2004) demonstraram um baixo poder discriminatório revelando, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes, ano e local de isolamento, mas recentemente uma análise dessas cepas por MLVA (Análise de Múltiplos Locos do número Variável de repetições em tandem) realizada por Oliveira (2006) revelou que elas apresentavam polimorfismo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 
- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P 2000. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR 1985. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 207-218.
- Almeida AMP, Tavares C, Leal-balbino TC 2005. Peste. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, p. 1509-1522.
- Bayllis CD, Field D, Moxon ER 2001. The simple sequence contingency loci of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Investigation* 107: 657-662.
- Bertherat E 2006. Abstract Interregional Plague Meeting, Antananarivo, Madagascar.
- Carniel E 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infection* 3: 561-569.
- Cornelis GR 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. *Proceedings National Academic Sciences USA* 97: 8778-8783.
- Coura JR, Silva JR, Oliveira Z, Lopes PFA 1967. Focos inveterados de peste no Brasil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1: 293-310.
- Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, Worsham P, Chu MC, Andersen GL 2006. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen *Journal of Bacteriology* 188: 4453-4463.
- Chu M 2000. *Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests*. CDC/WHO. Geneve, p. 129.
- Den Dunnen JT, Van Ommen GJB 1992. Methods for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38: 161-177.
- Deng W, Burland V, Plunkett 3RDG, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, Perna NT, Rosedj M, Zhou S, Schwartz DC, Fetherston JD, Linder LE, Brubaker RR, Planogv Straley SC, Mcdonough KA, Nilles ML, Matson JS, Blattner FR, Perry RD 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *Journal of Bacteriology* 184: 4601-11.

- 
- Du Y, Rosqvist R, Forsberg A 2002. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis, *Infection Immunology* 70: 1453-1463.
- Fetherston JD, Schuetze P, Perry RD 1992. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Molecular Microbiology* 6: 2693-2704.
- Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM, Protsenko O A 1990. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. *Fems Microbiology Letters* 67: 45-48.
- Filippov AA, Oleinikov PN, Motin VL, Protsenko OA, Smirnov GB 1995. Sequencing of two *Yersinia pestis* IS elements, IS285 and IS100. *Contributions Microbiology and Immunology* 17: 306-309.
- FUNASA 2002. Peste, in: *Guia de Vigilância Epidemiológica* 5: 641-652.
- Girard JM, Wagner DW, Vogler AJ, Keys C, Allender CJ, Drickamer LC 2004. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 8408-8413.
- Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, Grimont PAD, Lefevre M, Carniel E 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 32:634-641.
- Grimont F, Grimont PAD 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales do Institut Pasteur/Microbiologic* 137: 165-175.
- Hinnebusch BJ, Perry RD, Schwan TG 1996. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas *Science* 273: 367-370.
- Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG, Forsberg A 2002. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector *Science* 296: 733-735.
- Hinnebusch BJ 2003. Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flea vector of plague. *Advances of Experimental Medicine and Biology* 529: 55-62.
- Huang X, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE 2002. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1164-1173.

- 
- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF, Layton M, Mcdade J, Osterholm MT, O'toole T, Parker G, Perl TM, Russel PK, Schoch-Spana M, Tonat K 2000. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense 283: 2281-2290.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 314: 67-73.
- Karimi Y 1978. Diagnostic rapid de l'infection pesteuse au laboratoire. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales 71:45-48.
- Kostman Y, Edlind TD, Lipuma JJ, Stull TL 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction rubotyping. Journal of Clinical Microbiology. 30:2082-2087.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham LP, Wong J, Keim P 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. Journal of Clinical Microbiology 39: 3179-3185.
- Leal NC, Almeida AMP 1999. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex –PCR. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 41:339-342.
- Leal NC 1998. Potencial do uso de PCR e hibridização com sondas moleculares no estudo da *Yersinia pestis*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 126pp.
- Leal NC, Abath FGC, Almeida LC, Almeida AMP 1996. A simple PCR based procedure for plague diagnosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 38: 371-375.
- LeFlèche P, Hauck Y, Onteniente I, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G 2001. A tandem repeats database of bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiology 1:2.
- Lindler LU, Plano GV, Burland V, Mayhew G, Blattner FR 1998. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. Infection and Immunity 66: 5731-5742.

- 
- Lindstedt BA 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26: 2567-2582.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC, Gage KL 2005. Identifying sources of human exposure to plague. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 650-656.
- Mahillon J, Chandler M 1998. Insertion sequence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 725-774.
- Meunier JR, Grimont PA 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research Microbiology* 144: 373-379.
- Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, Slezak TR, Sokhansanj BA, Regala WM, Brubaker RR, Garcia E 2002. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *Journal of Bacteriology* 184: 1019-1027.
- Oliveira MBM 2006. Diversidade Genética em cepas de *Yersinia pestis*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100pp.
- Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebaihia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdano-Tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413: 523-527.
- Perry RD, Fetherston JD 1997. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 35-66.
- Simonet M, Riot B, Fortinean N, Berche P 1996. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *FEMS Microbiology Letters* 67: 375-379.
- Silva ACM 2004. Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS100. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 61pp.

- 
- Sobreira M 2002. Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100 pp.
- Sodeinde OA, Gouguen JD 1988. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infection Immunity* 56: 2743-2748.
- Sodeinde OA, Sample AK, Brubaker RR, Gouguen JD 1988. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. *Infection Immunity* 56: 2749-2752.
- Song Y, Tong Z, Wang J, Wang L, Guo Z, Han Y, Zhang J, Pei D, Zhou D, Qin H, Pang X, Han Y, Zhai J, Li M, Cui B, Qi Z, Jin L, Dai R, Chen F, Li S, Ye C, Du Z, Lin W, Wang J, Yu J, Yang H, Wang J, Huang P, Yang R 2004. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Research* 11: 179-197.
- Souza GT 2005. Avaliação da técnica Nests-PCRTbU para aplicação no diagnóstico da peste, Mestrado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 114 pp.
- Strand STA, Prolla RM, Liskay M 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.
- Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, Verbrugh H 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 62: 275-93.
- WHO/PAHO 1965. Plague in the Americas. Scientific Publication 115: 44-68.

ARTIGO

**Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil**

**ME Júnior-Pessoa<sup>1</sup>, MR Araújo<sup>1</sup>, GT Souza<sup>1</sup>, S Santos<sup>1</sup>, MBM Oliveira<sup>1</sup>, TC Leal-Balbino<sup>1</sup>, NC Leal<sup>1</sup>, AMP Almeida<sup>1</sup>.**

---

1 Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz,MS.

---

E-mail do autor de correspondência: [aalmeida@cpqam.fiocruz.br](mailto:aalmeida@cpqam.fiocruz.br)

Palavras Chave: *Yersinia pestis*, VNTR, MLVA.

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

---

## Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no Foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil

ME Pessoa-Júnior<sup>1</sup>, MR Araújo<sup>1</sup>, GT Souza<sup>1</sup>, S Santos<sup>1</sup>, MBM Oliveira<sup>1</sup>, TC Leal-Balbino<sup>1</sup>, NC Leal<sup>1</sup>, AMP Almeida<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz,MS.

### Resumo

Um conjunto de vinte cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante a investigação de uma epizootia em um foco da Chapada do Araripe, município de Exu, Pernambuco, Brasil, em agosto de 1967, foi analisado em locos VNTR (número variável de repetições em tandem). As cepas, conservadas na bacterioteca do SRP (Serviço de Referência em Peste), foram reativadas e a identificação bacteriológica confirmada pela suscetibilidade ao bacteriófago antipestoso. Alterações no genoma foram pesquisadas pela presença ou ausência de genes de virulência nos plasmídeos prototípicos da *Y. pestis* e na Ilha de Patogenicidade (HPI) das yersínias através da multiplex-PCR. As cepas revelaram-se geneticamente relacionadas, por MLVA (análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem), o que reflete a relação epidemiológica desses isolados.

### Introdução

A *Yersinia pestis*, bactéria da família Enterobacteriaceae, foi responsável por três grandes pandemias de peste e ainda persiste em várias regiões da Ásia, África e Américas, com notificação de casos humanos associados à infecção de reservatórios animais em áreas rurais (Perry & Fetherston 1997).

---

A reemergência da peste na Índia, Equador e Argélia, a ocorrência de epidemias como a que ocorre na República Democrática do Congo (RDC) e a possibilidade de uso da *Y. pestis* como arma biológica em atos terroristas renovaram o interesse sobre o estudo do bacilo e o desenvolvimento de técnicas que possibilitem determinar a origem e rastrear as cepas durante eventos inusitados. O conhecimento das características dos isolados de cada foco permitirá detectar a introdução de uma nova cepa e a sua origem, se de outro foco ou por ato deliberado (Inglesby et al. 2000; Gage & Kosoy 2005; Bertherat 2006).

O Regulamento Sanitário Internacional (RSI) vigente, preconiza que as áreas de foco devem ser mantidas sob vigilância permanente para detecção precoce da atividade pestosa, visando o acionamento imediato de medidas de controle adequadas para evitar a epidemização da doença.

No Brasil, a *Y. pestis* circula em vários focos localizados nas regiões Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia) e Sudeste (Norte de Minas Gerais e Rio de Janeiro) e a vigilância da peste baseia-se na pesquisa da bactéria em roedores reservatórios e pulgas vetores e de anticorpos antipestosos em animais sentinela (algumas espécies de roedores e carnívoros domésticos, como os cães e gatos) (FUNASA 2002). A partir de 1966, a atividade de vigilância nos focos no Brasil possibilitou o isolamento de 917 cepas de *Y. pestis* oriundas de roedores e outros pequenos mamíferos, pulgas, carrapatos e humanos, nos diferentes focos de peste no Nordeste brasileiro. A última cepa foi isolada em 1997 e a coleção é mantida na bacterioteca do Serviço de Referência em Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRP/CPqAM) (Baltazard 1968; Almeida et al. 1985; Aragão et al. 2002).

Os estudos de tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* por diferentes técnicas, como a RAPD-PCR (Leal 1998), PCR-ribotipagem (Sobreira 2002) e RFLP-IS100 (Silva 2004), revelaram, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre elas, independentemente das fontes, procedência e ano, demonstrando um baixo poder discriminatório. Recentemente, porém, Oliveira (2006), num estudo com MLVA (análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem), mostrou que as cepas de *Y. pestis* apresentam polimorfismo.

---

A proposta desse trabalho foi encontrar marcadores moleculares que reflitam a relação entre as cepas isoladas de roedores e pulgas durante uma epizootia ocorrida em 1967, no foco da Chapada do Araripe, para estabelecer, o padrão genético de bacilos obtidos durante um mesmo evento epidemiológico. A abordagem utilizada foi a análise do polimorfismo do número variável de repetições em tandem (MLVA).

## **Métodos**

### Bactérias e condições de cultivo

Foram estudadas 20 cepas de *Y. pestis* pertencentes a Bacterioteca do SRP-CPqAM. As cepas avaliadas foram isoladas anteriormente por Almeida et al (1985) em agosto de 1967, a partir de material de roedores e pulgas do sítio Alagoinha, município de Exu. As cepas estavam acondicionadas em meio BAB sob refrigeração e identificadas por P (Peste), Exu (Isolado do PPP em Exu) segundo número de ordem dos isolados, no entanto dois cultivos subsequentes em diferentes períodos foram realizados em substituição às culturas originais (Tabela 1).

Para os estudos as duas subculturas de cada cepa foram inoculadas no caldo BHI (Brain Heart Infusion broth, Difco), incubadas a 28°C e inspecionadas diariamente por até sete dias. Cada cultura crescida durante esse período foi plaqueada em duas placas de BAB (uma para teste com o bacteriófago antipestoso para confirmação da identificação e pureza do cultivo), incubadas a 28°C e inspecionadas diariamente por até cinco dias para visualização da lise pelo fago e observação da morfologia das colônias desenvolvidas. Colônias morfologicamente diferentes de cada placa foram repicadas para meio BHI para extração do DNA e teste com o bacteriófago antipestoso (Karimi 1978).

### Extração do DNA genômico

Um mililitro da cultura em BHI foi centrifugado a 12.000rpm a 4°C, o sobrenadante descartado, o sedimento suspenso em 500µl de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado homogeneizado com 500µl de TE, 10µl de lisozima (10mg/ml) e 10µl de proteinase K (5mg/ml). A suspensão foi incubada a 60°C por

---

20 minutos seguido da adição de 100µl de STE (SDS 2,5%; Tris-HCl 10mM pH8,0; EDTA 0,25M), 15 minutos de incubação a 60°C, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130µl de acetato de amônio 7,5M, mantida no banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos. Aproximadamente 700µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol a -70°C por 30 minutos ou a -20°C por 24 horas seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 10µl de água deionizada estéril e conservado a -20°C. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V e visualização sob luz ultravioleta (UV) após coloração em solução de brometo de etídio (15mg/ml). A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *Hind* III usando o programa Kodak 1D (Image Analysis software).

#### Análise da presença de marcadores de patogenicidade

A presença dos plasmídeos prototípicos (pPst, pYV e pFra) e da ilha de patogenicidade (HPI) da *Y. pestis* foi inferida pela técnica Multiplex-PCR utilizando iniciadores ou primers dirigidos a três genes de virulência (*pla*, *lcrV*, *caf1*) presentes em cada um dos plasmídeos, respectivamente e para o gene cromossomal *irp2* da HPI. As seqüências dos primers e as condições da reação foram descritas em Leal & Almeida (1999) (Tabela 2). Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em todas as reações.

Os segmentos amplificados através da multiplex-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Borato sob voltagem de 100V, corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador sob UV e digitalizados em câmara Kodak usando o programa Kodak 1D (Image Analysis software) Como padrão de peso molecular foi usado o marcador “100 base-pair DNA ladder” (Invitrogen, Brasil).

### PCR-ribotipagem

O DNA extraído de cinco culturas que apresentaram colônias com morfologia diversas, pequenas (lisas) e grandes (rugosas), o DNA dos isolados que apresentaram dois subcultivos (P. Exu 57 1S e 2S, P. Exu 60 1S e 2S), os isolados do pool de pulgas (P. Exu 44 1S) e do seu roedor hospedeiro (P. Exu 53 2S) foram submetidos à reação de PCR-ribotipagem para confirmar a identidade genética da espécie. Foi usado a amplificação por PCR utilizando os primers desenhados por Kostman et al (1992) dirigidos às seqüências conservadas dos genes 16S-23S do rDNA. As reações foram realizadas como descrito por Pereira et al (2002). Um controle negativo, sem DNA, foi incluído. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e analisados nas mesmas condições citadas para a reação de Multiplex-PCR.

### Amplificação por PCR dos locos VNTRs

As regiões dos VNTR foram amplificadas utilizando seis pares de primers: 1AB (Adair et al. 2000), ms06 e ms46 (LeFlèche et al. 2001), M34, M37 e M58 (Klevytska et al. 2001) contemplando seis locos VNTRs (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL por tubo, contendo 20 ng de DNA, 20 pmol de cada primer, tampão (pH8) 50 mM, desoxinucleotídeo trifosfato 0,16 mM (dNTP-Invitrogen, Brasil), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil).

As reações foram realizadas em termociclador Biometra. Os ciclos térmicos consistiam de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C durante 1 minuto e 72°C por 1 minuto terminando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos como adotado por Oliveira (2006), nas reações com os primers 1AB. Para os demais primers foi utilizado os parâmetros já descritos na literatura (LeFlèche et al. 2001; Klevytska et al. 2001).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, utilizando o mesmo marcador de peso molecular de 100 pares de base e visualizado nas mesmas condições citadas anteriormente.

---

O peso molecular foi calculado pelo programa Kodak 1D (Image Analysis software). O tamanho dos segmentos polimórficos obtidos pela amplificação com os primers ms06 foi aproximado para contemplar os múltiplos do número de repeats (60 pb). O número de repeats foi registrado como característica de cada alelo.

## Resultados

As 20 cepas do estoque estavam acondicionadas em dois subcultivos que levou a tentativa de recuperação de 40 culturas (duas culturas por cepa) correspondendo a subcultivos subsequentes realizados em diversos anos (Tabela 1). Em cinco culturas em placas de BAB foram observados dois tipos de colônias morfológicamente diferentes (colônias grandes e colônias pequenas). Foi obtido crescimento em 22 culturas sendo seis do primeiro subcultivo e 16 do segundo.

Culturas pareadas dos dois subcultivos foram recuperadas de duas cepas (P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S) e colônias grandes e pequenas das cepas P. Exu 47 2S, P. Exu 54 2S, P. Exu 57 2S, P. Exu 59 2S e P. Exu 74 2S, assim como as culturas obtidas respectivamente do roedor hospedeiro (P. Exu 53) e de suas pulgas (P. Exu 44) foram submetidas à reação de Ribotipagem-PCR gerando um perfil único (Figuras 1 e 2).

Dez culturas (cinco do primeiro subcultivo e cinco do segundo) amplificaram todos os segmentos correspondentes aos genes plasmidiais e da HPI; dez culturas (uma do primeiro subcultivo e nove do segundo) não amplificaram o gene *pla*. O gene *lcrV* foi amplificado em todas as culturas exceto em duas (segundo subcultivo). Uma cultura (segundo subcultivo) só amplificou o gene *lcrV*. Duas culturas (segundo subcultivo) não amplificaram o gene *caf1* e em três o *irp2* não foi amplificado (uma do primeiro subcultivo e duas do segundo). Nas subculturas pareadas de duas cepas os quatro genes foram amplificados apenas no primeiro subcultivo, no segundo o gene *pla* não foi mais amplificado (Tabela 1 e Figura 3).

Dos seis VNTRs analisados cinco se revelaram monomórficos gerando amplicons de aproximadamente 250 pb (1AB, ms46), 380 pb (M58), 350 pb (M37) e 230 pb (M34) (Figura 4). Apenas o VNTR ms06 se revelou polimórfico gerando três alelos de 600, 660 e

---

720 pares de base (pb) (Figura 5). O tamanho do repeat do VNTR ms06 (60 pb) é a base da diversidade dos amplicons. O alelo de 600 pb foi observado em cinco culturas do primeiro subcultivo e em 12 do segundo; o de 660 pb em uma cultura do primeiro subcultivo e duas do segundo e o alelo de 720 pb em duas culturas do segundo subcultivo. As culturas pareadas das duas cepas P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S revelaram os mesmos perfis de VNTR (600 pb).

Três cepas (P. Exu 47 2S, P. Exu 60 2S, P. Exu 74 2S colônias pequenas e grandes), apresentaram um fragmento de aproximadamente 600 pares de base, duas cepas (P. Exu 54 2S colônias pequenas e grandes) apresentaram um fragmento de 660 pares de base e uma cepa a P. Exu 59 2S, colônia grande apresentou um fragmento de 720 pares de base. O DNA da colônia pequena desta mesma cepa (P. Exu 59 2S) apresentou um alelo atípico com duas bandas de 600 e 660 pb (Figura 5). Os perfis de VNTR das culturas obtidas do roedor hospedeiro (P. Exu 53 2S) e de suas pulgas (P. Exu 44 1S) foram diferentes com alelos de 600 pb e 660 pb respectivamente (Tabela 1).

Os dois tipos de colônias morfológicamente diferentes (colônias grandes e colônias pequenas) revelaram os três alelos. Em três cepas (P. Exu 47 2S, P. Exu 60 2S, P. Exu 74 2S), colônias pequenas e grandes foi observado o mesmo perfil P 600. A P. Exu 57 2S, colônias pequenas e grandes apresentaram o alelo de 660 pares de base. O alelo de 720 pb foi encontrado na cepa P. Exu 59 2S colônia grande enquanto a colônia pequena desta cepa apresentou um alelo atípico com duas bandas de 600 e 660 pb, que também foi observado na subcultivo da P. Exu 59 2S colônia pequena (Figura 5).

## **Discussão**

A MLVA tornou-se uma ferramenta útil nos estudos filogenéticos e epidemiológicos da *Y. pestis* por revelar a heterogeneidade dessa espécie, considerada até então homogênea, e permitir o rastreamento de cepas durante os surtos (Klevytska et al 2001; Le Flèche et al 2001; Pourcel et al 2004; Lowell et al 2005). A homologia em cepas determinantes de um surto foi constatada por Lowell et al (2005), que também demonstraram que cepas não relacionadas epidemiologicamente podem apresentar diferentes perfis em estudos por essa técnica.

---

Alterações genética foi detectada por multiplex-PCR em algumas cepas. Foi observada a ausência do gene *pla* e provável perda do plasmídeo pPst, na cultura originada do pool de pulgas e ausência do gene *irp2* nos isolados do roedor e de suas pulgas. Os subcultivos efetuados e as condições de conservação das culturas podem ser responsabilizados por essas alterações, como relataram Leal et al. (1999; 2000) ao constatarem alterações no genoma (plasmidiais e no cromossomo) de cepas brasileiras de *Y. pestis* estocadas e manipuladas no SRP/CPqAM.

No nosso estudo por MLVA, os repiques sucessivos das culturas P. Exu 57 1S (primeiro subcultivo), P. Exu 57 2S (segundo subcultivo), P. Exu 60 1S (primeiro subcultivo) e P. Exu 60 2S (segundo subcultivo) não acarretaram perda ou ganho de repeats, uma vez que apresentaram o mesmo número de unidades. Oliveira (2006) também não detectou alteração nos VNTRs em culturas parentais e subculturas derivadas por cultivos sucessivos de três cepas e Leal-Balbino et al. (2001) observaram estabilidade *in vitro* em uma cepa submetida a sucessivos repiques.

Um fato interessante observado no decorrer da pesquisa foi que colônias fenotipicamente diferentes (colônias pequenas e grandes) de uma mesma cultura (P. Exu 59 e P. Exu 60) apresentaram alelos diferentes para o mesmo marcador VNTR. Nestas cepas diferentemente das colônias grandes, cujo VNTR é monomórfico, as pequenas apresentam dois alelos. Esse achado sugere uma população mista em um mesmo cultivo, o que justificaria os dois alelos. Essa situação é característica de VNTRs presentes em microsátélites e não em minisátélites (Le Flèche et al 2001), como é o caso do loco ms06. Uma possível contaminação da cultura, foi descartada pela ribotipagem-PCR que revelou um padrão homogêneo para colônias pequenas e grandes dessas culturas.

Uma cepa isolada de um pool de pulgas (P. Exu 44 1S) e outra isolada de seu roedor hospedeiro (P. Exu 53 2S) surpreendentemente apresentaram alelos diferentes para o mesmo marcador (ms06) com variação de um repeat. Dessa maneira, o polimorfismo nesse VNTR (ms06), isoladamente não é ideal para identificar este grupo de cepas e assim o seu valor para estudos epidemiológicos é limitado.

Os resultados obtidos justificam conceder prioridade e investir maciçamente no estudo do maior número possível de VNTRs, o que possibilitará a constituição de um banco

---

de padrões característicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, permitindo a comparação da taxa de variação desses locos com a de possíveis clones não relacionados, bem como o rastreamento de novas cepas introduzidas natural ou deliberadamente no foco.

Neste trabalho, as cepas de *Y. pestis* obtidas durante a investigação de uma epizootia de curta duração apresentaram uma estreita relação genética revelada por cinco marcadores monomórficos e pelo polimorfismo em apenas um marcador VNTR (ms06). Essa conclusão baseia-se no modelo proposto por Girard et al. (2004) para determinação dos ciclos de transmissão de *Y. pestis* por meio da taxa de mutação para marcadores VNTR e respalda-se nos resultados obtidos por Oliveira (2006), que trabalhou com cepas de diversas procedências, fontes e anos de isolamento em que três de seis VNTRs eram polimórficos.

Ao mesmo tempo, reconhecemos a necessidade da análise de um maior número de VNTR para que fique mais evidente a relação genética dessas cepas, quando comparadas com cepas de outros focos.

### Referências Bibliográficas

- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P 2000. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR 1985. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 207-218.
- Aragão AI, Seoane ACM, Leal TCA, Leal NC 2002. Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1991-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 143-148.
- Baltazard M 1968. Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35:143-148.
- Bertherat E 2006. Abstract Interregional Plague Meeting, Antananarivo, Madagascar.
- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF, Layton M, Mcdade J, Osterholm MT, O'toole T,

- 
- Parker G, Perl TM, Russel PK, Schoch-Spana M, Tonat K 2000. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense 283: 2281-2290.
- Gage KL, Kosoy M.Y 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. Annual Review of Entomology 50:505-528.
- Girard JM, Wagner DW, Vogler AJ, Keys C, Allender CJ, Drickamer LC 2004. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 8408-8413.
- FUNASA 2002. Peste, in: Guia de Vigilância Epidemiológica 5: 641-652.
- Karimi Y 1978. Diagnostic rapid de l'infection pesteuse au laboratoire. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales 71:45-48.
- Kostmam Y, Edlind TD, Lipuma JJ, Stull TL 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction rubotyping. Journal of Clinical Microbiology. 30:2082-2087.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham LP, Wong J, Keim P 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. Journal of Clinical Microbiology 39: 3179-3185.
- Leal NC 1998. Potencial do uso de PCR e hibridização com sondas moleculares no estudo da *Yersinia pestis*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 102pp.
- Leal NC, Almeida AMP 1999. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex –PCR. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 41:339-342.
- Leal NC, Almeida AMP, Leal TCA, Sobreira M 2000. Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. Brazilian Journal Microbiol. 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC 2001. Análise dos plasmídeos e do loco *pgm* em diferentes cepas de *Yersinia pestis* Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100pp.
- LeFlèche P, Hauck Y, Onteniente I, Prieur A, Denoeud F, Ramiise V, Sylvestre P, Benson G, Ramiise F, Vergnaud G 2001. A tandem repeats database of bacterial genomes:

- 
- application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiology 1:2.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC, Gage KL 2005. Identifying sources of human exposure to plague. Journal of Clinical Microbiology 43: 650-656.
- Oliveira MBM 2006. Diversidade Genética em cepas de *Yersinia pestis*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100pp.
- Perry RD, Fetherston JD 1997. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. Clinical Microbiology Reviews 10: 35-66.
- Pereira MSV; Leal NC; Leal, TCA; et al. 2002. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Letters in Applied Microbiology 34:1-5.
- Pourcel C, Andre-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Verganaud G 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. Microbiology 4: 22.
- Silva ACM 2004. Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS100. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 61pp.
- Sobreira M 2002. Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100 pp.

Tabela 1: Características dos isolados de *Yersinia pestis*, segundo a data de isolamento, procedência, perfis de virulência e VNTR.

Isolados	Procedência	Data isolamento	1S	2S	Genes de virulência				VNTR ms06
					<i>pla</i>	<i>lcrV</i>	<i>caf1</i>	<i>irp2</i>	
P. Exu 30 2S	07 Pbj de 04 B1	03/08		26/05/88	-	+	+	+	P600
P. Exu 31 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	04/08		26/05/88	+	+	+	+	P600
P. Exu 33 1S	<i>Bolomys lasiurus</i>	05/08	10/01/78		+	+	+	+	P600
P. Exu 35 2S	01 Pbj de 01 B1	06/08		25/05/88	-	+	+	+	P600
P. Exu 36 2S	02 Pbj de 04 B1	07/08		08/06/88	+	-	+	+	P660
P. Exu 39 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	09/08		08/06/88	+	+	+	+	P600
P. Exu 40 1S	<i>Bolomys lasiurus</i>	12/08	15/05/72		+	+	+	+	P600
P. Exu 42 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	13/08		08/06/88	-	+	-	+	P600
P. Exu 44 1S	05 Pbj de 10 B1	14/08	15/05/72		-	+	+	-	P660
P. Exu 47 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	16/08		08/06/88	+	+	+	+	P600
P. Exu 48 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	16/08		08/06/88	-	+	-	-	P600
P. Exu 51 1S	<i>Bolomys lasiurus</i>	18/08	14/05/72		+	+	+	+	P600
P. Exu 53 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	19/08		23/06/88	+	+	+	-	P600
P. Exu 54 2S	<i>Rattus rattus</i>	19/08		23/06/88	-	+	+	+	P660
P. Exu 57 1S	<i>Bolomys lasiurus</i>	23/08	14/05/72		+	+	+	+	P600
P. Exu 57 2S				23/06/88	-	+	+	+	P600
P. Exu 59 2S	06 Pbj de 06 B1	23/08		23/06/88	+	+	+	+	P720
P. Exu 60 1S	<i>Rattus rattus</i>	23/08	25/04/80		+	+	+	+	P600
P. Exu 60 2S				23/06/88	-	+	+	+	P600
P. Exu 61 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	23/08		23/06/88	-	+	+	+	P600
P. Exu 67 2S	<i>Bolomys lasiurus</i>	26/08		28/07/88	+	+	+	+	P720
P. Exu 74 2S	03 Xc piso casa	27/08		28/07/88	-	-	+	+	P600

P600 = 600 pb; P660 = 660 pb; P720 = 720 pb, Pbj = pulgas *Polygenis bolhsi jordani*; Xc = *Xenopsylla cheopis*, B1 = *Bolomys lasiurus*, 1S = primeiro subcultivo; 2S = segundo subcultivo

Tabela 2: Primers utilizados na amplificação dos genes de virulência da *Yersinia pestis*.

Primers	Gene	Tamanho	Localização
5'-CGC GAA TTC GAC GTA ATA TAT GAA AAA AAT CA-3' 5'-CCG CTG CAG ATT ATT GGT TAG ATA CGG-3'	<i>cafI</i>	500 pb	Plasmídeo pFra
5'-AGA GCC TAC GAA CAA AAC CCA C-3' 5'-GCA GGT GGT GGC AAA GTG AGA T-3'	<i>lcrV</i>	800 pb	Plasmídeo pYV
5'-AAG TTCTAT TGT GGC AAC C-3' 5'-GAA GCG ATA TTG CAG ACC-3'	<i>pla</i>	920 pb	Plasmídeo pPst
5'-AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC-3' 5'-TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT-3'	<i>irp2</i>	300 pb	Cromossomo

pb = pares de base

Tabela 3: Características dos VNTRs analisados em cepas de *Yersinia pestis*.

Primers	VNTR / n° de bases do repeat	Fonte
5'-GGTTAGGTAGGGTGTGAAG-3' 5'-AAAGAGGCTAAGTGGCAA-3'	1 AB / 4	Adair et al. 2000
5'-CAGGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG-3' 5'-CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA-3'	ms46 / 7	Le Flèche et al. 2001
5'-AATTTTGCTCCCCAAATAGCAT-3' 5'-TTTTCCCATTAGCGAAATAAGTA-3'	ms06 / 60	Le Flèche et al. 2001
5'-GAATCGCGGGTTGACGCTGTTGAGC-3' 5'-GCTGAACAGCCCCATAAAACCGGAGC-3'	M34 / 9	Klevytska et al. 2001
5'-GCCACAGGAAGAGGACATTTTCAGAGAAAAC-3' 5'-GTTGCTAAAACGATACCGCTACGATCAGC-3'	M37 / 10	Klevytska et al. 2001
5'-GCGATAACCCACATTATCACAATAACCAACAC-3' 5'-GCTGATGGAACCGGTATGCTGAATTTGC-3'	M58 / 17	Klevytska et al. 2001

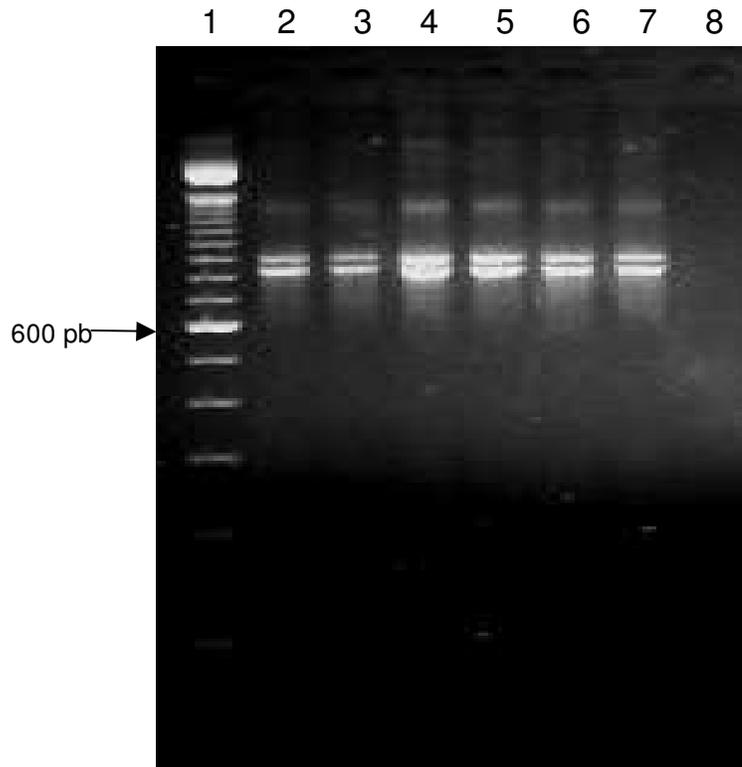


Figura 1. Gel de agarose 2% representativo da ribotipagem-PCR de culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 44 1S, 3: P. Exu 53 2S, 4: P. Exu 57 1S, 5: P. Exu 57 2S, 6: P. Exu 60 1S, 7: P. Exu 60 2S, 8: controle negativo.

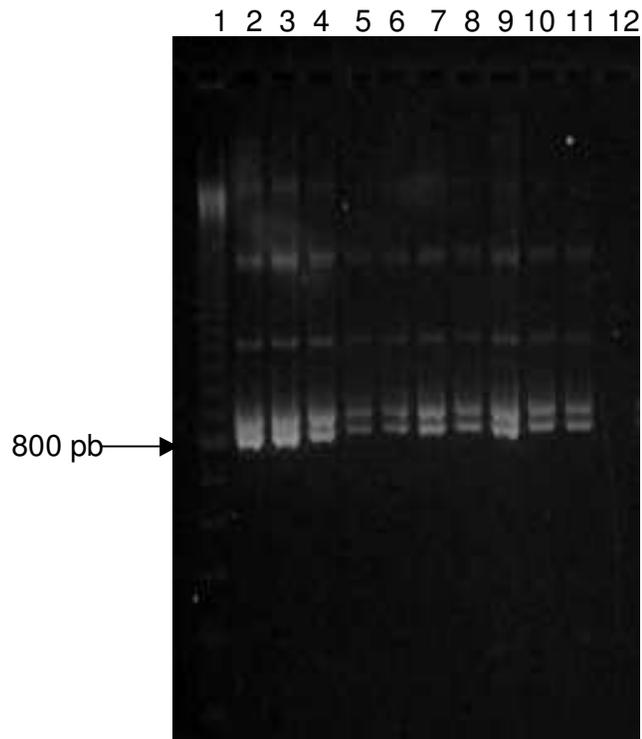


Figura 2. Gel de agarose 2% representativo da ribotipagem-PCR, colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder, 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu 60 2S cg, 10: P. Exu 74 2S cp, 11: P. Exu 74 2S cg., 12: controle negativo.

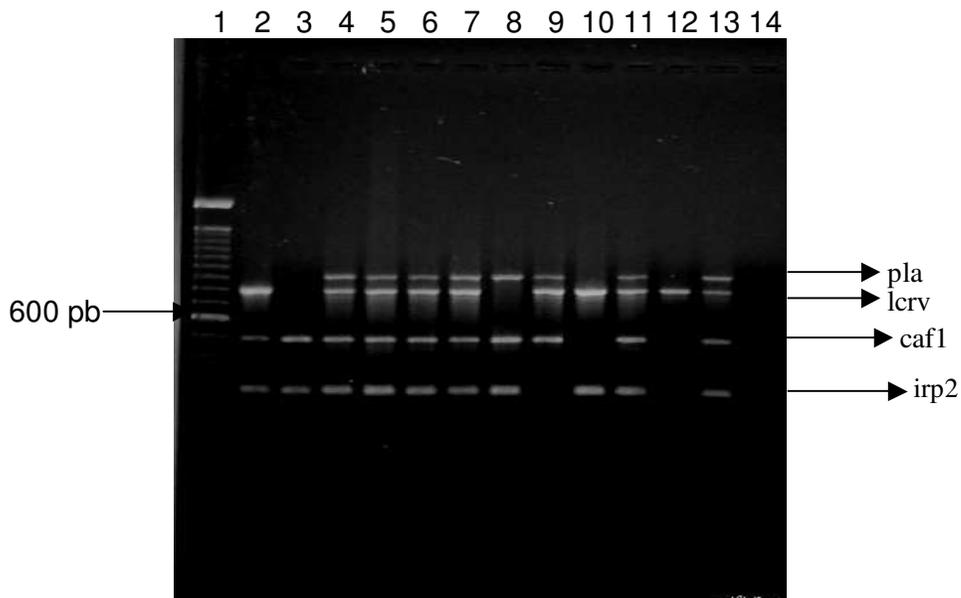


Figura 3. Gel de agarose 1% representativo dos produtos das ampliações, por Multiplex-PCR, dos genes de virulência *pla*, *lcrV*, *caf1*, *irp2* nas culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder, 2: P. Exu 54 2S, 3: P. Exu 74 2S, 4: P. Exu 31 2S, 5: P. Exu 51 1S, 6: P. Exu 67 2S, 7: P. Exu 59 2S, 8: P. Exu 36 2S, 9: P. Exu 53 2S, 10: P. Exu 42 2S, 11: P. Exu 61 2S, 12: P. Exu 48 2S, 13: P. Exu 39 2S. 14: controle negativo.

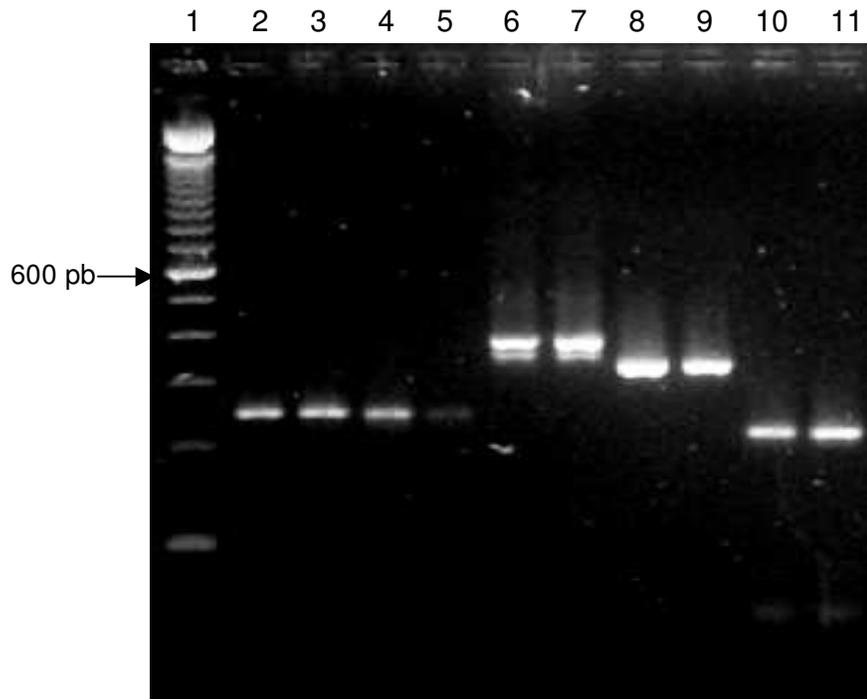


Figura 4. Gel de agarose 2,5% representativo das ampliações, por PCR, dos VNTRs das culturas de *Y. pestis* com os primers 1AB, Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 36 2S e 3: P. Exu 42 2S; com os primers ms46, linhas 4: P. Exu 30 2S e 5: P. Exu 40 1S; com os primers M58 linhas 6: P. Exu 67 2S e 7: P. Exu 61 2S; com os primers M37, linhas 8: P. Exu 60 2S e 9: P. Exu 30 1S; com os primers M34 linhas 10: P. Exu 59 2S e 11: P. Exu 47 2S.

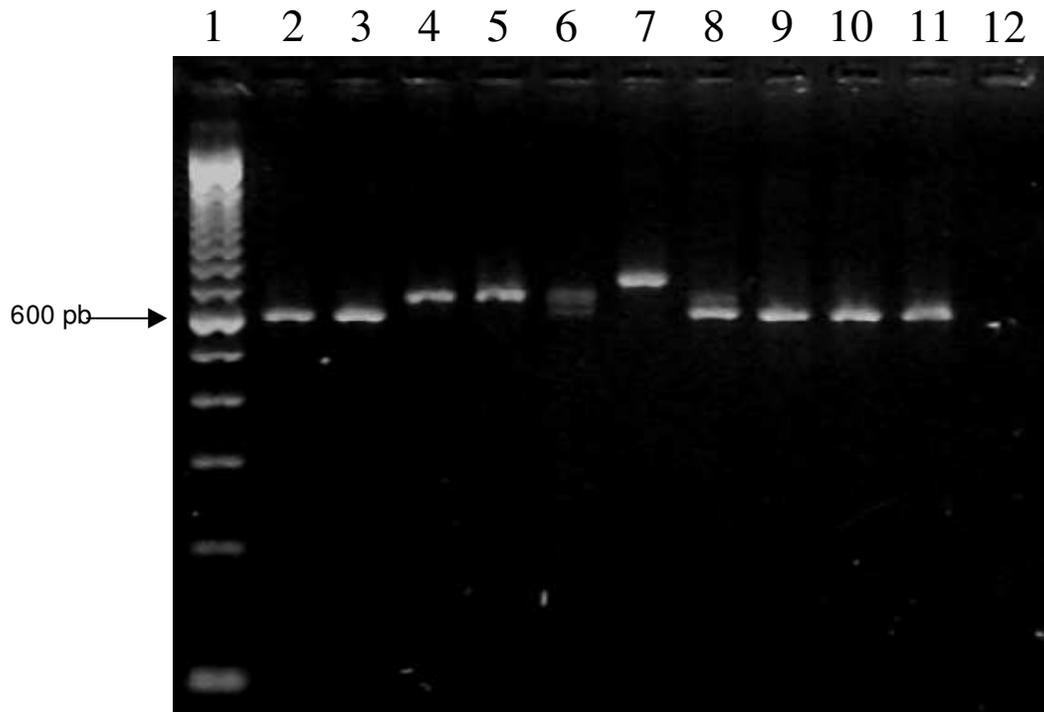


Figura 5. Gel de agarose 2,5% representativo das amplificações, por PCR, com os primers ms06 e colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: "100 bp DNA ladder", 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu 60 2S cg, 10: P. Exu 74 2S cp, 11: P. Exu 74 2S cg, 12: controle negativo.

## CONCLUSÕES

- As cepas de *Y. pestis* obtidas durante a investigação de uma epizootia de curta duração apresentaram uma estreita relação genética revelada por cinco marcadores monomórficos e pelo polimorfismo em apenas um marcador (ms06).
- Ao mesmo tempo, reconhecemos a necessidade da análise de um maior número de VNTR para que fique mais evidente a relação genética dessas cepas, quando comparadas com cepas de outros focos.

## **ANEXOS**



ISSN 0074-0276

versão impressa

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### Objetivos e política editorial

As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos. Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, devem ser checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área. A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores. Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação. Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

---

Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos. Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos. Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:

- Carta de submissão do trabalho, assinada por todos os autores, especificando o autor de contato, bem como endereço, telefone, fax e e-mail.

- Quatro cópias completas do artigo, incluindo as ilustrações e um disquete contendo o texto, tabelas, gráficos e fotografias digitalizadas.
- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.
- A seqüência do artigo deve ser: título resumido (com até 40 caracteres - letras e espaços), título (com até 250 caracteres), autores (sem títulos ou graduação), afiliação institucional (endereço completo somente do autor correspondente), resumo, palavras-chave, notas de rodapé indicando a fonte de financiamento ou mudanças de endereço, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos (os mínimos necessários), referências, tabelas (fora do texto e com título), e figuras (com legendas em folha separada).
- Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já aceito, deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação. Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail ([memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br) / [memorias@ioc.fiocruz.br](mailto:memorias@ioc.fiocruz.br))

#### Formato e estilo

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: título corrente, título, nomes dos autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, introdução, materiais

---

e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Patrocínios devem ser mencionados em nota de rodapé na primeira página.

**Resumo:** Com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves), o resumo deve apresentar os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos (seleção dos temas de estudo ou animais de laboratório; métodos analíticos ou de observação), as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível), e as principais conclusões. Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

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

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

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

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

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

---

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

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

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

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar a List of Journals Indexed no Index Medicus publicada no número de janeiro do Index Medicus ou no website <http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>.

- No texto, usar o sobrenome dos autores e a data:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é

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

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

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

- No final do trabalho, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

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

Livro ou Tese

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

Capítulo de livro

---

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

Ilustrações: As ilustrações devem ser limitadas ao mínimo necessário para exemplificar estruturas ou condições particulares, para sintetizar dados ou para registrar resultados quantitativos. Detalhes de resultados apresentados nessa forma não devem ser repetidos no texto. Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- Figuras devem ser apresentadas em uma folha de mesmo tamanho que as do manuscrito. As fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante. As fotografias e os desenhos devem ser marcados no verso com o nome do autor, o número da figura e uma seta indicando a parte de cima da ilustração. Se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (7 cm) ou na largura completa (14.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As legendas devem ser encaminhadas em uma folha separada. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa sem custos para os autores.

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

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

---

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

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

- um disquete contendo o texto completo da versão final aprovada do manuscrito (incluindo tabelas e gráficos), processado em um editor de texto como Word ou Word Perfect para Windows (formato Macintosh deverá ser convertido);

- uma declaração assinada por todos os autores afirmando que:

- (i) todos os dados contidos no trabalho são precisos;
- (ii) todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;
- (iii) o manuscrito ora apresentado a essa revista não está sendo publicado no todo ou em parte por outra revista, assim como não está sendo encaminhado para outra publicação. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;

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

Taxas: A revista não cobra taxas para publicação.

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

Separatas: Os autores receberão 30 separatas gratuitamente. Junto, um formulário de pedidos e uma lista de preços serão enviados aos autores, permitindo que novas separatas sejam solicitadas

---

## Checklist para os manuscritos

Os autores devem verificar cada um dos itens abaixo antes de enviar seus manuscritos a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Incluir uma carta de apresentação assinada por todos os autores, junto com o manuscrito, especificando o nome do autor que será responsável pela correspondência, assim como endereço, números de telefone e fax, e e-mail.

Enviar quatro cópias do manuscrito (original mais três cópias), cada uma acompanhada de um jogo completo de ilustrações.

Todo o manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser digitado em espaço duplo, usando fonte tamanho 12, e impresso em folhas de papel de tamanho padrão. Margens esquerdas e direitas devem ser de pelo menos 3 cm.

As páginas devem ser numeradas a partir da página de rosto.

A página de rosto deve incluir um cabeçalho com no máximo 40 letras e espaços, um título de no máximo três linhas impressas (250 letras e espaços), nomes dos autores (não citar títulos ou graus), afiliações institucionais, endereço completo do autor responsável pela correspondência, e notas de rodapé indicando as fontes de recursos financeiros e mudanças de endereço.

A ordem de apresentação do material em todos os manuscritos deve ser a seguinte: cabeçalho, título, autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, notas de rodapé, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, tabelas, legendas para as figuras, e figuras.

As referências devem ser citadas no texto entre parênteses, por exemplo, (Chagas 1909). As referências não citadas no texto não podem aparecer na seção de referências. As referências bibliográficas devem seguir o formato estabelecido pelo "Index Medicus and Biological Abstract" (veja exemplos em [Formato e estilo](#)). Se um trabalho não publicado de autoria de um dos autores do manuscrito for citado (ou seja, um artigo "in press"), será necessário incluir a carta de aceitação da revista que publicará o referido artigo. Se dados não publicados pertencentes a outros pesquisadores forem citados pelo manuscrito, será necessário incluir uma carta de autorização dos respectivos autores dos referidos dados. Incluir quatro impressões de cada figura em papel fotográfico ou

produzidas por laser. Identificar todas as figuras com o nome do primeiro autor e o número da figura (por meio de uma etiqueta auto-adesiva datilografada e colada no verso da figura). Incluir uma legenda para cada figura. As legendas devem ser apresentadas em folha separada no final do manuscrito. As tabelas também devem ser apresentadas em folhas separadas no final do manuscrito. Um título breve e descritivo deve encabeçar cada tabela. Para outras informações, consultar as Instruções aos Autores publicadas no primeiro número de cada volume da revista.

© 1997-2005 Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365

21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil

Tel.: +55 21 2598-4335

Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442