

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ÉRIKA DE CÁSSIA VIEIRA DA COSTA

CONTRIBUIÇÃO À VIGILÂNCIA E AO DIAGNÓSTICO DA PESTE BUBÔNICA

Recife

2016

ÉRIKA DE CÁSSIA VIEIRA DA COSTA

CONTRIBUIÇÃO À VIGILÂNCIA E AO DIAGNÓSTICO DA PESTE BUBÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife
2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Costa, Érika de Cássia Vieira da

Contribuição à vigilância e ao diagnóstico da peste bubônica. / Érika de Cássia Vieira da Costa. – Recife: O Autor, 2016.

96 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexo

1. Peste 2. *Yersinia pestis* 3. Roedor- doenças I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (orient.) II. Título

616.9232

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-442

CONTRIBUIÇÃO À VIGILÂNCIA E AO DIAGNÓSTICO DA PESTE BUBÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Data de Aprovação: 29/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida - Orientadora

Dra. Carina Lucena Mendes Marques – Membro externo/Titular
FIOCRUZ/PE

Dra. Maria Edileusa Felinto de Brito – Membro externo/Titular
FIOCRUZ/PE

Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira– Membro externo/Titular

Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues– Membro externo/Titular

Dra Nilma Cintra Leal– Membro externo/Suplente

Profº. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior– Membro interno/Suplente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo Amor, Força, amizade e cuidados constantes. Sou alvo do seu amor e misericórdia! Grata por tornar tudo possível, sem Ele eu nada sou.

Ao meu pai Marcondes, pelo amor e incentivo, a minha querida mãe Elionilde, pelo amor, amizade e esperança que um dia sua filha conseguiria. “Obrigada pelo ensino da verdade, humildade e amor que vêm de Deus. Vocês sempre acreditaram em minha vitória.” Amo vocês!

À Profª Drª Alzira Almeida pelo apoio, oportunidades e orientação deste trabalho.

À Profª Drª Marise Sobreira, pela amizade, confiança e exemplo de profissionalismo. Você será para sempre minha eterna professora.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia do CPqAM, especialmente a Silvana Santos, Fabiana Laura e Lívia Alves, por todos os momentos que compartilhamos. Valeu pela paciência de ouvir meus desabafos.

Aos técnicos José Dantas e Kátia Galindo, por todo apoio laboratorial.

Ao meu esposo, Alexandre de Moraes, pelo companheirismo e paciência, nos momentos de desespero. Obrigada por sonhar comigo. Deus é por nós!

A todos meus familiares, especialmente a minha querida irmã Mayse Cíntia e tias amadas, que são torre forte de orações e conselhos. Minha eterna gratidão.

Aos queridos colegas “amantes do Meio Ambiente”, Murilo Chagas, Morgana Albuquerque, Bruna Maldonado e Ana Maria, pela força, incentivo e compreensão.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ-PE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/UFPE, pelo apoio técnico e científico.

Minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Tudo é possível ao que crê”
(Jesus Cristo)

RESUMO

A peste, infecção por *Yersinia pestis*, é uma zoonose de grande importância epidemiológica mundial e no Brasil. A peste é uma doença principalmente de roedores silvestres e suas pulgas/vetores, mas pode afetar os seres humanos e outros mamíferos. Mais de 200 espécies de roedores são hospedeiros/reservatórios da infecção. No Brasil, a infecção permanece em focos naturais localizados em vários complexos ecológicos da região Nordeste, norte de Minas Gerais e na Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro. Os conhecimentos atuais sobre as populações de roedores e suas pulgas/ectoparasitas nas áreas focais de peste assim como a prevalência da infecção entre roedores e pulgas são insuficientes. O monitoramento das áreas focais da peste exige a disponibilidade de métodos de diagnóstico rápidos, simples e eficientes utilizando técnicas sensíveis e específicas aplicáveis às diversas amostras biológicas de diferentes origens (homem, roedores, carnívoros domésticos e selvagens). Nosso objetivo foi atualizar as informações sobre os roedores e outros pequenos mamíferos nos focos de peste do Nordeste do Brasil, desenvolver e avaliar uma técnica imunoenzimática (ELISA-ProteinA) para aplicação nas atividades de diagnóstico e vigilância da peste. No período de 2013-2015 foram realizadas nove expedições de uma semana cada, às áreas focais de peste historicamente mais importantes nos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia, onde foram coletados 392 roedores e outros pequenos mamíferos (marsupiais). As análises bacteriológicas e moleculares realizadas nas amostras de tecidos dos animais foram negativas para a *Y. pestis* e apenas um animal se revelou positivo nas análises sorológicas. Apesar da baixa prevalência da infecção encontrada, a densidade e a diversidade de reservatórios/hospedeiros nas áreas focais evidencia a necessidade de incrementar os estudos nesses locais. Conjugados formados pela proteína A do *Staphylococcus aureus* (ProteinA) ligada a enzimas representam uma alternativa no desenvolvimento de testes sorológicos, já que essa proteína possui afinidade universal com imunoglobulinas de diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens. Visando otimizar a metodologia das atividades de vigilância e controle da peste no Brasil, ensaios foram realizados para avaliar o desempenho da técnica imunoenzimática ELISA proteína-A utilizando um conjugado composto pela proteína A ligada a peroxidase. Os resultados mostraram que pela sensibilidade e especificidade o teste permite descartar as amostras com reações inespecíficas ou falso positivas desde a triagem o que repercute em grande ganho de tempo e economia de material.

Palavras-chave: Peste. *Yersinia pestis*. Roedores. Carnívoros domésticos e silvestres. ELISA. Proteína A.

ABSTRACT

The plague, *Yersinia pestis* infection, is a zoonosis of major epidemiological importance worldwide. Plague is primarily a disease of wild rodents and their flea/vectors, but can affect humans and other mammals. More than 200 species of rodents are hosts/reservoirs of the infection. In Brazil, the infection remains in natural foci located in several ecological complexes of Northeast, north of Minas Gerais and in the Serra dos Órgãos, in Rio de Janeiro. Current knowledge on the rodent and flea/ectoparasite populations from plague focal areas, as well as, the prevalence of infection among rodents and fleas are wanting. The monitoring of the plague focal areas requires the availability of quick, simple and efficient diagnosis methods using sensitive and specific techniques suited to various biological samples of different origins (human, rodents, domestic and wild carnivores). Our aim was to update the information on rodents and other small mammals from plague foci in the Northeast of Brazil, to develop and evaluate an enzyme immunoassay (ELISA protein-A) for use in plague diagnostic and surveillance activities. In the period of 2013-2015 nine one week each expeditions were held to the historically most important plague areas in the states of Pernambuco, Ceará and Bahia, where 392 rodents and other small mammals (marsupials) were collected. Bacteriological and molecular analyzes of animal tissue samples were negative for *Y. pestis* and only one animal proved positive in serological tests. Despite this low infection prevalence, the density and diversity of reservoir/hosts in the focal areas highlights the need for strengthen research in these areas. Conjugates of *Staphylococcus aureus* protein A linked to enzymes represent an alternative in the development of serological tests, since this protein has universal affinity with immunoglobulins from various species of domestic and wild mammals. To optimize the methodology of plague monitoring and control activities in Brazil essays were conducted to evaluate the performance of an enzyme immunoassay (ELISA protein A) using a conjugate composed of protein A linked to peroxidase. By the sensitivity and specificity observed the test allows discarding non-specific or false positive samples since from the screening, which constitutes time and material savings.

Keywords: Plague. *Yersinia pestis*. Rodents. Domestic and wild carnivores. ELISA. Protein A.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Microscopia óptica da <i>Yersinia pestis</i> corada pelo método Wright Giemsa	20
Figura 2. Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Yersinia pestis</i>	21
Figura 3. Pulga <i>Xenopsylla cheopis</i> ingurgitada com sangue	23
Figura 4. Esquema do Ciclo epidemiológico da peste	24
Figura 5. Número de casos humanos de peste por país da América Latina, 2000-2012	27
Figura 6. Principais roedores hospedeiros da peste no Brasil	31
Figura 7. Áreas de peste no Brasil	32
Figura 8. Pacientes acometidos com as três formas clínicas da peste	35
Figura 9. Perfil diferencial nas manifestações clínicas da peste (bubônica e pneumônica)	35
Figura 10. Fluxograma de investigação de caso suspeito	36
Figura 11. Teste do bacteriófago	42
Figura 12. Teste de hemaglutinação (HA/HI) em placas de microtitulação de 96 poços em U.	47
Figura 13. Microplaca de poliestireno de 96 poços, fundo chato, destacando as amostras positivas de coelho nos poços coloridos de azul (reação substrato/enzima), com o cromógeno ABTS e as amostras negativas à esquerda na ausência de coloração	49
Figura 14. Esquema das modalidades do ELISA	50
Tabela 1. Peste humana, número de casos (e óbitos) registrados no mundo, 2010-2015	26
Quadro 1. Denominação atual e as diferentes denominações anteriores dos roedores	30

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1:

Figura 1. Plague foci in Brazil and study areas

61

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1: Tabela 1. Distribution of the trapped animals by geographical origin	62
Tabela 2. Bacteriological culturing and hemagglutination (HA) and protein A Elisa tests for analyzed animals	62
ARTIGO 3: Tabela 1. Distribuição por ano e por estado das amostras de soros de cães HA positivas examinadas e positivas pelo ELISA proteína-A	89
Tabela 2. Percentual de amostras de soros de cães HA positivas examinadas e positivas pelo ELISA proteína-A em relação ao título de anticorpos hemaglutinantes	90

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
EIA/EIE	Enzyme Immunoassay/Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da Hemaglutinação
ID	Imunofluorescência Direta
IEC	Informação, Educação, Comunicação
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LNC	Lista de Notificação Compulsória
MS	Ministério da Saúde
ng	nanograma
PHEIC	Public Health Emergency of International Concern
SCPH	Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISPESTE	Sistema de Informação do Programa de Controle da Peste
SRP	Serviço Nacional de Referência em Peste
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
μ g	micrograma
μ L	microlitro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1. A Peste	18
4.1.1. Histórico	18
4.1.2. Etiologia	19
4.1.3. Fatores de virulência da <i>Yersinia pestis</i>	21
4.1.4. Ciclo epidemiológico.....	22
4.1.5. Os reservatórios e os focos da peste no Brasil	28
4.1.6. Formas clínicas	33
4.1.7. Tratamento.....	37
4.1.8. Controle e prevenção	38
4.1.9. Diagnóstico da peste	39
4.1.9.1. Diagnóstico diferencial.....	39
4.1.9.2. Diagnóstico laboratorial	39
4.1.9.2.1. Bacteriologia.....	40
Exame direto.....	40
Imunofluorescência direta	40
Cultura	41
Teste Rápido para pesquisa de FI (Fita reagente).....	42
4.1.9.2.2. Molecular.....	42
PCR.....	43
Multiplex PCR.....	43
Nested PCR	44
Nested PCR tubo único	44
LAMP	45
4.1.9.2.3. Sorologia.....	45
Hemaglutinação passiva (HA)	45

Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA)	47
Matrizes alternativas	51
Utilização da Proteína A.....	51
5. REFERÊNCIAS	53
6. METODOLOGIA E RESULTADOS.....	58
ARTIGO 1: Rodents and other small mammal reservoirs in plague foci in northeastern Brazil	59
ARTIGO 2: Emprego do teste ELISA Proteína-A para diagnóstico sorológico da peste bubônica.....	65
ARTIGO 3: Ensaio imunoenzimático ELISA Proteína-A para vigilância da peste em cães domésticos.....	77
7. CONCLUSÃO	91
8. PERSPECTIVAS.....	92
9. ANEXOS	93
ANEXO A: Fluxograma de notificação dos agravos sujeitos ao Regulamento Sanitário Internacional (RSI).....	94

1. INTRODUÇÃO

A peste, considerada uma das doenças mais devastadoras que afetou a humanidade, ocasionou a morte de milhões de pessoas ao longo de três pandemias de grande importância histórica. Apesar de menor incidência global atualmente, ela ainda constitui um problema mundial de saúde pública, porque pode ressurgir depois de períodos de silêncio epidemiológico mais ou menos prolongados, trazendo seríssimas consequências médicas e socioeconômicas, além da possibilidade de o bacilo da peste ser utilizado como arma biológica em ações de bioterrorismo.

A peste causa um impacto significativo na saúde pública e de rápida disseminação podendo gerar uma emergência de saúde pública internacional que exige notificação, segundo o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) vigente. No Brasil está inserida na Lista de Notificação Compulsória (LNC) de agravos.

A peste é uma zoonose causada pela bactéria gram-negativa *Yersinia pestis*, primordialmente uma doença de roedores, transmitida principalmente pela picada de pulgas infectadas que pode afetar o homem e outros mamíferos. A infecção humana pode se manifestar sob diversas formas clínicas, sendo as mais comuns as formas bubônica, pneumônica e septicêmica, todas de caráter severo. A existência de uma forma benigna ou *pestis minor* caracterizada por discreto acometimento clínico merece confirmação.

Mundialmente, a peste tende a reaparecer após décadas de aparente controle, com grande potencial epidêmico. Foi durante a última pandemia que a peste chegou ao Brasil. O primeiro caso da doença foi registrado em outubro de 1899, em Santos - São Paulo e em seguida, estendeu-se pelas cidades litorâneas e seu entorno (peste portuária); dispersando-se pelas cidades do interior (peste urbana), de onde foi eliminada por medidas sanitárias adequadas. Após 30 anos, aproximadamente, de sua introdução no país, ela assumiu caráter enzootico, fixando-se entre os roedores silvestres (peste rural), estabelecendo focos naturais em vários complexos ecológicos localizados desde o Ceará até o norte de Minas Gerais (denominado Foco do Nordeste) e na Serra dos Órgãos no Rio de Janeiro.

No Brasil, os estudos sobre as populações dos roedores nas áreas focais datam de quase duas décadas e o conhecimento atual sobre os roedores foi diminuindo ao longo dos anos. Por isso, nosso trabalho teve como objetivos atualizar as informações sobre os roedores e outros pequenos mamíferos nos focos de peste do Nordeste do Brasil, além de desenvolver e avaliar novo teste diagnóstico para aperfeiçoamento da metodologia das atividades de vigilância e controle da peste.

Os resultados são apresentados no formato de três artigos com informações atualizadas sobre os roedores e outros pequenos mamíferos de áreas pestosas historicamente, mais importantes no Nordeste do Brasil. Destaca-se também, a padronização de um teste imunoenzimático utilizando um conjugado composto da Proteína A do *Staphylococcus aureus*, para diagnóstico da peste nos diversos elementos envolvidos no ciclo epidemiológico da infecção (humanos, roedores e outros pequenos mamíferos e animais sentinela, os cães domésticos).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do último caso humano de peste no Brasil confirmado laboratorialmente ter sido registrado em 2005, no estado do Ceará e nos outros estados não haver notificação há vários anos ou até algumas décadas, a detecção de anticorpos antipestosos nos animais-sentinela nas áreas monitoradas, significa que a infecção continua ativa nos focos. Além disso, casos clinicamente suspeitos de peste sem confirmação laboratorial são continuamente registrados nas áreas históricas da doença no Ceará. Sendo assim, destaca-se a necessidade da vigilância constante em locais com relatos anteriores da enfermidade e com as características epidemiológicas favoráveis, como também o desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos mais sensíveis, rápidos e eficazes, que facilitem a detecção precoce e o desencadeamento imediato das possíveis medidas de tratamento e controle.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Atualizar as informações sobre os roedores e outros pequenos mamíferos dos focos de peste do Nordeste do Brasil e subsidiar a metodologia do diagnóstico laboratorial da peste.

3.2 Objetivos Específicos

- Atualizar as informações sobre os roedores e outros pequenos mamíferos nos focos de peste do Nordeste do Brasil;
- Padronizar um teste imunoenzimático (ELISA-Proteína A) para diagnóstico da peste nos diversos elementos envolvidos no ciclo epidemiológico da infecção utilizando um conjugado composto da Proteína A do *Staphylococcus aureus*;
- Aplicar o ensaio imunoenzimático Proteína-A em amostras sorológicas de pacientes humanos, roedores e outros pequenos mamíferos e nos animais sentinela, os cães domésticos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A Peste

4.1.1 Histórico

A peste tem uma longa história na humanidade, existem numerosas referências de relatos antigos da doença, que datam da era pré-Cristã, encontrados na Bíblia, mais precisamente no II Livro de Samuel (POLLITZER, 1954). Estudos recentes sugerem a existência da infecção como endêmica nas populações humanas da Eurásia, antes de quaisquer gravações históricas de pandemias. As pesquisas de RASMUSSEN et al., (2015) evidenciaram vestígios do DNA do bacilo da peste em dentes humanos na Ásia e na Europa que datam da Idade do bronze, 2.800 a 5.000 anos atrás.

Três pandemias bem caracterizadas foram registradas na era Cristã: A primeira, denominada Peste de Justiniano ocorreu entre os anos de 542-602 d.C, com início no Egito e grande disseminação por todo mundo civilizado, incluindo Ásia, África e Europa, tendo alta letalidade, em torno de 100 milhões de mortes (POLLITZER, 1954; PERRY; FETHERSTON, 1997).

A segunda pandemia teve início na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, que foi conhecida como Peste Negra e persistiu do século XIV ao século XVI, matando quase 30% da população europeia, através de sua principal forma clínica, a pneumônica (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

A terceira pandemia ou pandemia Contemporânea originou-se na Mongólia e se estendeu para Hong Kong em 1894 e de lá se expandiu mundialmente através do transporte marítimo, atingindo regiões até então indenizadas (PERRY; FETHERSTON, 1997). Apenas durante a Segunda Guerra Mundial, quando os antigos navios foram afundados e substituídos por modernos navios à prova de ratos, é que essa pandemia deixou de se expandir (MOLLARET, 1989). Contudo, ela deixou focos endêmicos por todos os continentes, exceto na Austrália.

Foi durante a terceira pandemia, que o bacilo da peste foi isolado pela primeira vez por Alexandre Yersin em junho de 1894, em cadáveres humanos e em ratos (*Rattus rattus*), e quatro anos depois Paul-Louis Simond descobriu o papel da pulga na transmissão da doença (DRANCOURT; RAOULT, 2002).

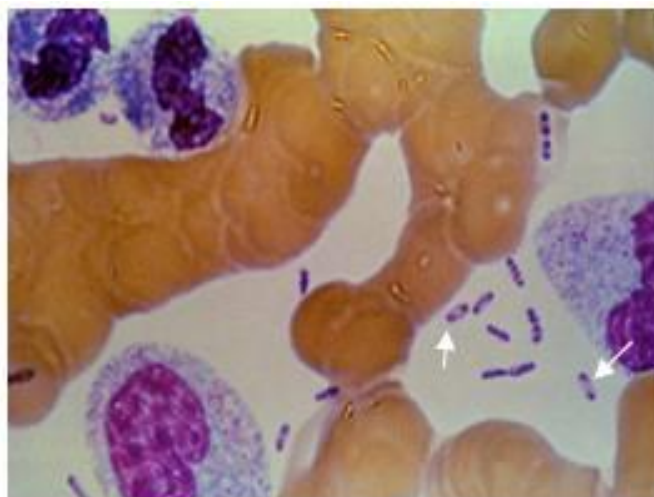
Nessa pandemia, a infecção pestosa atingiu a região das Américas, leste da África, África do Sul, Madagascar e Indochina, penetrando principalmente pelas cidades portuárias (SCHNEIDER et al., 2014). No Brasil, penetrou pelo porto de Santos, no estado de São Paulo, em outubro de 1899, onde ocorreu o primeiro caso humano da doença. Inicialmente, assolou cidades litorâneas (peste portuária), a partir de 1907 através de ferrovias e rodovias chegou às cidades interioranas (peste urbana), sendo eliminada por medidas sanitárias adequadas, que incluíam a eliminação de roedores e pulgas, e o tratamento dos doentes graças à disponibilidade de meios eficazes (inseticidas, rodenticidas e drogas para tratamento dos doentes). Posteriormente, a infecção se estabeleceu na zona rural entre os roedores silvestres, em áreas que apresentavam condições ecológicas adequadas para a sobrevivência do bacilo da peste e a transmissão (WHO, 1965; TAVARES et al., 2012).

4.1.2 Etiologia

O agente causador da peste, bacilo da peste ou bacilo pestoso, é denominado *Yersinia pestis*. O gênero *Yersinia* pertence à família Enterobacteriaceae e engloba atualmente 19 espécies, três das quais são patogênicas para o homem e outros animais: a *Y. pestis*, agente causador da peste e os enteropatógenos, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*, causadores de um quadro clínico chamado de Yersiniose, caracterizado por manifestações gastro-intestinais. Estudos genéticos sugeriram que a *Y. pestis* é um clone derivado da *Y. pseudotuberculosis* que evoluiu há 1.500 – 20.000 anos, provavelmente pouco antes da primeira pandemia (ACHTMAN et al., 2004; FALCÃO; SOUZA, 2015).

A *Y. pestis* recebeu várias denominações desde sua descoberta: *Bacterium pestis*, *Bacillus pestis*, *Pasteurella pestis*. Em microscopia óptica apresenta-se como um bacilo curto e ovóide (0,5-0,8 µm de diâmetro e de 1-3 µm de comprimento), mais claro no centro e extremidades escuras (coloração bipolar) pelos métodos de coloração policrômicos (Wright-Giemsa, Wayson), gram-negativa, não forma esporos, é aeróbia ou anaeróbica facultativa, cresce bem em meios usuais, como BHI (*Brain Heart Infusion*), BAB (*Blood Agar Base*) e LB (*Luria-Bertani*) a 28°C e pH entre 5 e 9 (Figura 1). Uma característica importante é sua capacidade de permanecer viável por anos em materiais como escarro, fezes de pulgas e tecidos protegidos (como a medula óssea) principalmente quando em baixas temperaturas (BRASIL, 2008).

Figura 1. Microscopia óptica de *Yersinia pestis* corada pelo método Wright Giemsa. As setas destacam os bacilos em amostra de tecido sanguíneo.



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

O esquema de classificação de subtipos mais antigo e tradicional utilizado para *Y. pestis*, (DEVIGNAT, 1953) envolve a utilização de ensaios fenotípicos baseados nos testes bioquímicos da fermentação do glicerol, da redução de nitrato em nitrito, que classificou a bactéria em três biovars: *Antiqua* ou *continental* (glicerol +; nitrato +), *Medievalis* (glicerol +; nitrato -); *Orientalis* ou *Oceânico* (glicerol -; nitrato +). Devignat (1953) com base em observações epidemiológicas e registros históricos associou cada um dos três biovar clássicos a uma das três pandemias históricas da peste. A inclusão do teste de fermentação da arabinose permitiu a identificação de um quarto biovar: *Microtus* (glicerol +; nitrato -; arabinose -).

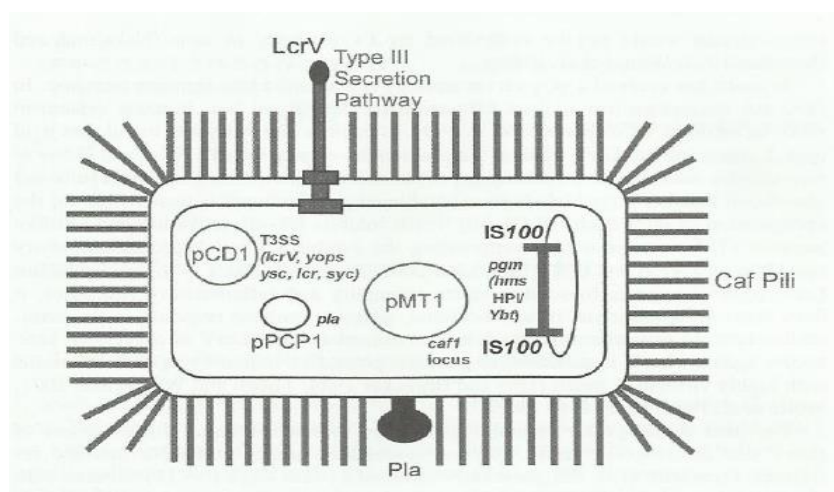
O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular possibilitou várias abordagens genômicas utilizando diversos marcadores moleculares (plasmídios, IS, VNTR, locos CRISPR, dentre outros), que estão sendo utilizados em diversos métodos de tipagem (perfil plasmidial, ribotipagem, MLVA, RAPD, PFGE, etc).

Alguns dos grupos intraespecíficos, de ecótipo e/ou biovars, identificados pelos diferentes esquemas de sub-tipagem têm diferentes distribuições geográficas, além de diferentes hospedeiros primários (DEVIGNAT, 1953; ANISIMOV et al., 2004; ALMEIDA; TAVARES, 2015; VOGLER et al., 2016).

4.1.3 Fatores de virulência da *Yersinia pestis*

Os fatores de virulência da *Y. pestis* auxiliam no processo de invasão/disseminação da bactéria no hospedeiro e/ou na sua transmissão, contribuindo diretamente com a aderência à célula eucariótica, interferindo no metabolismo e mecanismos de defesa celular (PRENTICE; RAHALISON, 2007). O genoma bacteriano é constituído de um cromossomo, com cerca de 4.650 kb, onde existe uma região considerada “ilha de alta patogenicidade” (HPI) e três plasmídios prototípicos, denominados pYV (± 70 kb), pFra (± 100 kb) e pPst ($\pm 9,5$ kb), que são fundamentais para a virulência das cepas (CARNIEL, 2001; SONG et. al., 2004) (Figura 2). Existem ainda várias sequências de inserção (*IS100*, *IS200*, *IS285*) presentes em todo o genoma da bactéria, além de um fago filamentososo (*YpfΦ*), cujo papel ainda não foi completamente esclarecido (CARNIEL, 2008).

Figura 2. Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Y. pestis*.



Fonte: CORNELIUS et al., 2007.

No cromossomo das *Yersínias* patogênicas (*Y. pestis* e dos enteropatógenos *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*), há uma região de 102 kb conhecida como loco *pgm*, que contém dois segmentos estrutural e funcionalmente distintos: o segmento de aquisição do ferro contendo o operon *ybt* no qual é codificado a 26°C a yersiniabactina, um sideróforo que confere as bactérias capacidade de competir efetivamente pelo nutriente com as moléculas ligadoras do ferro do hospedeiro (PRENTICE; RAHALISON, 2007), e o loco *hms*, que é determinante para a transmissão da bactéria pelas pulgas. Os produtos do *hms* atuam na colonização da pulga pela bactéria, na multiplicação bacteriana e consequente bloqueio do proventrículo da pulga, através da

formação de um biofilme, além de ativar na *Y. pestis*, diversos mecanismos de defesa contra a fagocitose e outros mecanismos imunes do hospedeiro (ZUREK et al., 2001; HINNEBUSH et al., 2002).

O plasmídio pFra (pFra/Tox ou pMT) específico da *Y. pestis* contém os genes responsáveis pela síntese da proteína F1 organizados no operon *f1* (*caf1M*, *caf1A*, *caf1*) (PRENTICE; RAHALISON, 2007). A F1 é antifagocitária e altamente imunogênica para o homem, roedores e outros mamíferos, sendo largamente empregada nas técnicas de diagnóstico da peste. Além disso, o pFra codifica a fosfolipase D a 26°C, anteriormente denominada toxina murina (Ymt), a qual auxilia a resistência da bactéria no tubo digestivo da pulga (HINNEBUSH et al., 2002).

O plasmídio pPst ou pPCP, também específico da *Y. pestis*, é portador do gene *pla* que codifica a proteína Pla. A proteína Pla é um ativador do plasminogênio, que promove a disseminação das bactérias a partir do local da picada da pulga, além de atuar na formação do bubão em hospedeiros mamíferos e o aumento da bacteremia (SEBBANE et al., 2006).

O plasmídio pYV (Lcr, pCad ou pCD1) existe nas três espécies de yersínia patogênicas, sendo essencial para a virulência dessas bactérias. O pYV codifica um sistema de secreção tipo III ou T3SS (Type Three Secretion System) e um conjunto de proteínas efetoras intracelulares (Yops - Yersinia outer proteins) e extracelulares (antígeno V- *lcrV*) que conferem às bactérias a habilidade de resistência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado (PERRY; FETHERSTON, 1997).

4.1.4 Ciclo Epidemiológico

A epidemiologia da peste é bastante complexa, além do ciclo enzoótico (entre hospedeiros naturais), há o ciclo epizoótico (silvestre) que inclui a transmissão da bactéria entre os roedores sensíveis, e o ciclo domiciliar ou urbano, que ocorre entre os animais domésticos e humanos, com roedores silvestres infectados e/ou suas pulgas. Já o ciclo pneumônico, refere-se à transmissão pessoa a pessoa (dêmico). Os fatores bióticos e abióticos do ambiente podem influenciar qualquer dos ciclos epidemiológico (BRASIL, 2008).

O bacilo pestoso é transmitido principalmente pela picada de pulgas infectadas, quando o artrópode ingere o sangue do hospedeiro contaminado e o bacilo se multiplica no seu estômago, preenchendo o proventrículo e determinando bloqueios totais ou parciais nesses órgãos. Essas pulgas bloqueadas são altamente infectantes, pois ao tentarem se alimentar, novamente, fazem um grande esforço para sugar, provocando regurgitação do conteúdo do proventrículo e consequente

inoculação da bactéria na corrente sanguínea do novo hospedeiro (HINNEBUSH, 2005) (Figura 3). A transmissão “mecânica” ocorre eventualmente através da introdução das bactérias contidas no aparelho bucal das pulgas não bloqueadas, quando elas se alimentam em um hospedeiro septicêmico e logo depois realiza o repasto em um novo hospedeiro. Estudos afirmam que os bacilos permanecem viáveis para infecção em até três horas no aparelho bucal desses vetores (EISEN; GAGE, 2009).

Mais de 200 espécies de pulgas já foram encontradas infectadas com *Y. pestis* (EISEN; GAGE, 2009). No Brasil, nas áreas focais do Nordeste, as espécies *Polygenis bohlsi jordani*, *P. tripus* (parasitas de roedores silvestres), *Xenopsylla cheopsis*, *Pulex irritans* (pulga do homem) e *Ctenocephalides felis* foram encontradas naturalmente infectadas pela *Y. pestis* (TAVARES et al., 2012). Dentre as pulgas, a espécie *X. cheopsis*, por sua facilidade de bloqueio, larga distribuição geográfica e grande capacidade em picar o homem, é considerada o principal vetor (EISEN; GAGE, 2009).

Figura 3: *Xenopsylla cheopsis* ingurgitada com sangue.



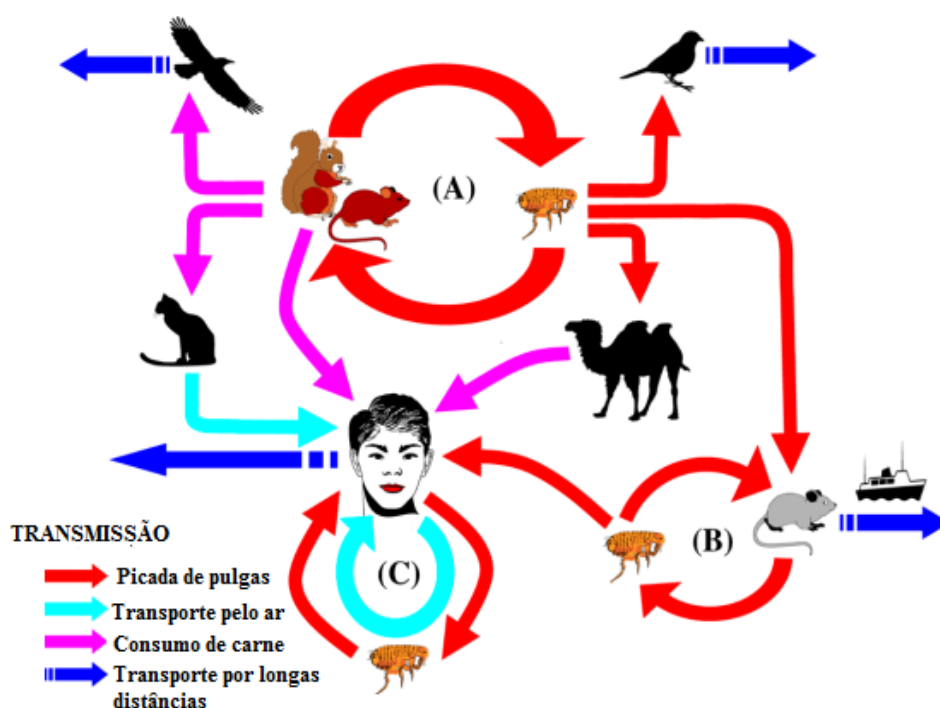
Fonte: <http://www.cdc.gov>.

Outras formas de transmissão além da picada da pulga podem ocorrer, por inalação de aerossóis, ingestão ou contato com tecidos infectados. A ocorrência da peste humana acontece de forma acidental, quando o homem invade o ecossistema dos roedores durante atividades de caça, agricultura, comércio ou lazer, ou pela introdução de roedores e pulgas infectados ao habitat humano (PERRY; FETHERSTON, 1997). Eventualmente a transmissão inter-humana também pode ocorrer, tanto por meio de aerossóis, acidentes com tecidos e materiais contaminados em

trabalho em campo ou no laboratório, como também através da disseminação da *Y. pestis* durante ataques bioterroristas (STENSETH et. al., 2008).

Animais como os lagomorfos (coelhos e lebres), alguns marsupiais (*Monodelphis domestica*), insetívoros (porco-espinho e mussaranho), carnívoros selvagens e domésticos (raposas, cães e gatos), assim como os camelos e macacos, podem contrair a peste. As aves são refratárias na infecção, porém podem principalmente, as de rapina e outras que utilizam tocas dos roedores para ninho, carrear pulgas e transportar carcaças infectadas para outras localidades, contribuindo para a disseminação da doença (GAGE; KOSOY, 2005; STENSETH et al., 2008) (Figura 4).

Figura 4: Esquema do ciclo epidemiológico da Peste. (A) Ciclo roedor silvestre-pulga (silvestre); (B) Ciclo roedor comensal-pulga (urbano); (C) Ciclo pneumônico (pessoa-pessoa). A cor das setas indica o mecanismo (picadas de pulgas, as partículas de ar, o consumo de carne), através do qual as bactérias são transferidas a partir de um hospedeiro para outro. Setas azuis escuras indicam maneiras em que a peste pode se expandir para outras áreas.



Fonte: STENSETH et al., 2008.

Os carnívoros domésticos, cães e gatos, podem se contaminar por via oral, pela ingestão de roedores contaminados e expandir essa infecção com a possibilidade desses animais conduzirem pulgas infectadas ou carcaças de roedores para o ambiente intra domiciliar (PERRY; FETHERSTON, 1997). Os cães habitualmente não desenvolvem manifestações clínicas importantes, enquanto os gatos podem apresentar as formas ganglionar, faríngea e a pneumônica da doença, sendo perigoso, já que podem determinar casos de peste pneumônica em humanos (WHO, 2010). Sobrevivendo à doença, esses animais passam a produzir anticorpos específicos que permanecem por até um ano, o que possibilita utilizá-los como animais indicadores-sentinela das atividades da infecção na natureza, de grande importância para a vigilância epidemiológica nos focos pestíferos (BRASIL, 2008).

A peste é uma doença endêmica em 26 países ao redor do mundo, com a maioria dos casos em regiões da África. A persistência nos focos, alternando fases de silêncio epidemiológico e epizootias, casos humanos esporádicos, são comuns no Brasil e no mundo, o que torna a peste um problema atual e merecedor de atenção (ALMEIDA; TAVARES, 2015; SCHNEIDER et al., 2014). De acordo com os registros de casos e óbitos em todo o mundo, cerca de 98% são provenientes do continente africano, sobretudo nos países de Madagascar, Tanzânia, Moçambique, Malawi, Uganda e República Democrática do Congo. A peste também é ameaça na América do Norte, no oeste dos EUA; América do Sul, no Brasil, Equador, Peru e Bolívia; na Ásia (China, Índia, Indonésia, Cazaquistão, Mongólia e Vietnã) e no sudoeste europeu (Tabela 1) (WHO, 2010; 2016).

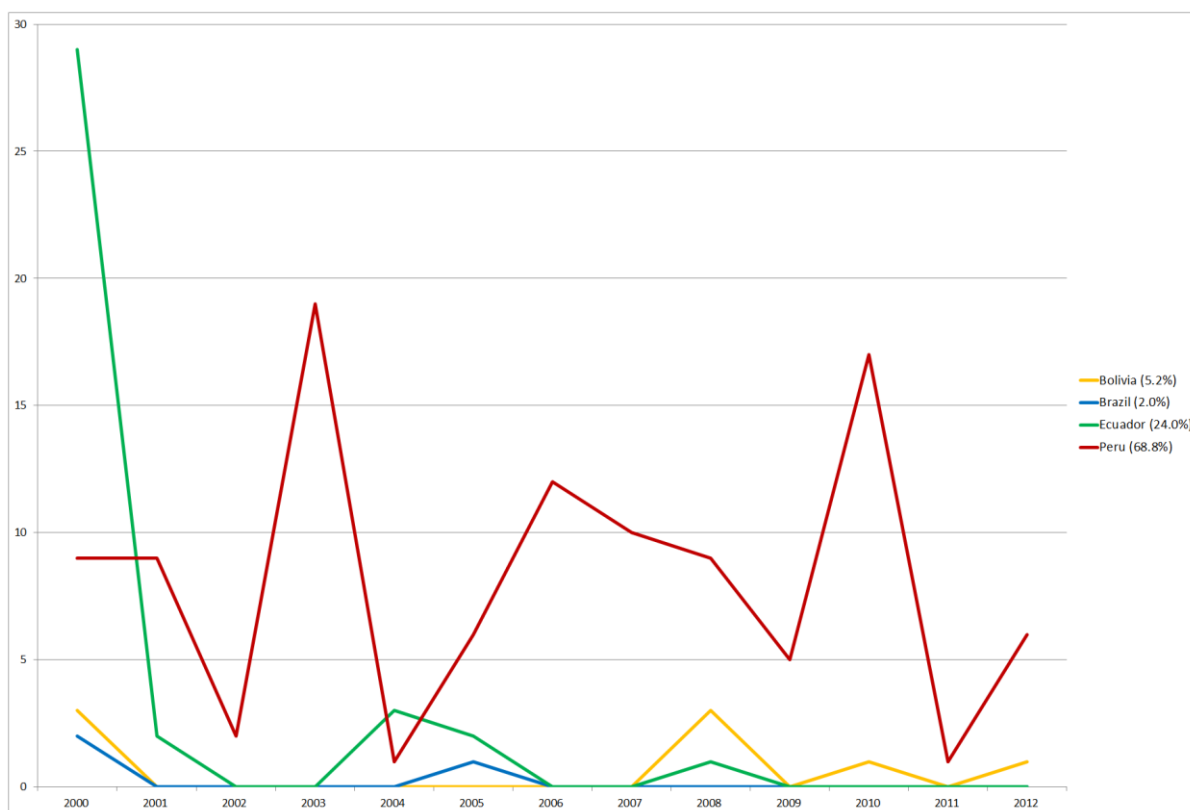
Tabela 1: Peste humana, número de casos (e óbitos) registrados no mundo, 2010-2015.

África	2010	2011	2012	2013	2014	2015
DRC	152 (11)	152 (19)	131 (15)	55 (5)	78 (12)	18 (5)
Madagascar	324 (30)	392 (93)	256 (60)	675 (118)	482 (112)	275 (63)
Uganda	14 (1)	14 (2)	22 (6)	13 (3)	6 (0)	3 (0)
URT	9 (2)	9 (1)	7 (0)	0 (0)	31 (1)	5 (2)
Total	499 (1)	567 (115)	416 (81)	743 (126)	597 (125)	301 (71)
RDC: República Democrática do Congo						
RUT: República Unida da Tanzânia						
Américas	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Bolívia	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
Peru	27 (4)	1 (0)	6 (0)	24 (2)	8 (1)	0 (0)
USA	2 (0)	3 (0)	4 (0)	4 (1)	10 (0)	16 (4)
Total	30 (5)	4 (0)	10 (0)	28 (3)	20 (2)	16 (4)
EUA: Estados Unidos da América						
Ásia	2010	2011	2012	2013	2014	2015
China	5 (1)	1 (1)	1 (0)	0 (0)	3 (3)	0 (0)
Federação Russa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)
Quirguistão	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
Mongólia	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	3 (2)
Total	5 (1)	2 (1)	1 (0)	1 (1)	5 (3)	3 (2)
Total Global	534 (50)	573 (116)	427 (81)	772 (130)	622 (130)	320 (77)

Fonte: WHO, 2016.

A Organização Mundial de Saúde relatou 772 casos mundialmente no ano de 2013, com 130 óbitos e um surto de peste em Madagascar (2014-2015), com pico em novembro de 2014, com predominância da peste pneumônica (WHO, 2016). Nos Estados Unidos entre 1900 e 2012, 1.006 casos humanos foram confirmados, com mais de 80% desses casos sendo da forma bubônica. Nas últimas décadas, uma média de sete casos de peste humana tem sido relatada a cada ano (intervalo: 1-17 casos por ano). Ocorrendo em pessoas de todas as idades e ambos os sexos, embora, historicamente, é um pouco mais comum entre os homens, provavelmente por causa do aumento das atividades ao ar livre que os colocam em maior risco (CDC, 2015). No geral, na América latina, pode-se observar queda dos números de casos, com incidência maior de casos no Peru. Contudo, no período de 2000 a 2012 foram notificados no total, 154 casos nos países latino americanos (SCHNEIDER et al., 2014) (Figura 5).

Figura 5: Número de casos humanos de peste por país da América Latina, 2000-2012.



Fonte: SCHNEIDER et al, 2014.

Nos focos de peste do Nordeste do Brasil, ocorriam até meados da década de 1980, de 20 a 100 casos anualmente, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. Já na década de 1990 houve um decréscimo nos registros de casos humanos, com tendência a quiescência, exceto nos focos da Bahia, onde foram notificados 206 casos, no período de 1987 a 2000 (SAAVEDRA; DIAS, 2011). No Ceará após oito anos de ausência de casos humanos, em 2005 foi confirmado um caso em Pedra Branca, o último notificado no Brasil, apesar de esporadicamente surgirem suspeitos, mas a hipótese tem sido afastada, após a investigação epidemiológica e diagnóstico laboratorial (ALMEIDA; TAVARES, 2015).

É possível que a qualquer momento, desequilíbrios ecológicos, sociais e causas ainda desconhecidas determinem o recrudescimento da zoonose, sendo o homem acometido novamente por sua forma epidêmica. Diante dessa possibilidade, se faz necessária a vigilância permanente nas áreas de foco, sendo equivocado acreditar que a peste é uma doença do passado (GAGE; KOSOY, 2005).

4.1.5 Os Reservatórios e os Focos da peste no Brasil

As principais fontes de infecção da peste, na natureza, são os roedores. Das duas mil espécies de roedores existentes no mundo, cerca de 230 espécies podem naturalmente albergar a *Y. pestis* e estão envolvidas no ciclo epidemiológico da doença. Em cada área focal a fauna pode se apresentar distintamente. A taxonomia de espécies de pequenos mamíferos tem sido constantemente revisada, com novos arranjos taxonômicos propostos, e novas espécies e gêneros descritos. Assim, o status taxonômico dos roedores brasileiros associados à peste foi revisto e atualizado, além de alguns roedores serem atribuídos a outros gêneros ou espécies (BONVICINO et al., 2015) (Quadro 1).

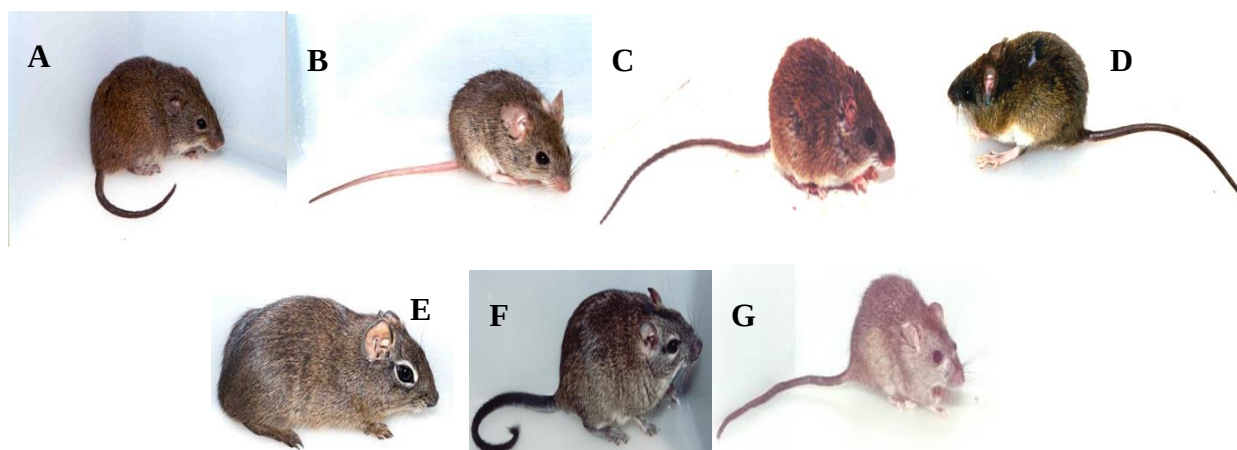
No Nordeste do Brasil, os principais roedores relacionados ao ciclo da doença pertencem aos gêneros: *Necromys* (*Zygodontomys*, *Bolomys*), *Calomys*, *Oligoryzomys* (*Oryzomys*), *Cerradomys* (*Oryzomys*), *Galea*, *Trychomys* (*Cercomys*) e *Rattus* (Figura 6). Algumas espécies de roedores podem apresentar maior resistência à peste, como o *Galea* e *R. rattus*, enquanto outros como o punaré (*Trichomys apereoides*) é extremamente sensível. Esses animais mantêm estreito relacionamento com o homem, pois, além de com ele dividirem os alimentos (gramíneas e cereais da roça), são fonte de proteínas, e na caça, pelo manuseio da carne contaminada, tornam-se fonte de graves infecções (BRASIL, 2008).

Os *Necromys lasiurus* são bastante sensíveis e apresentam papel amplificador na infecção, pois são responsáveis pela epizootização da peste nos focos do Nordeste, devido a sua grande capacidade reprodutiva, podendo atingir grande densidade populacional, susceptibilidade à bactéria e proximidade ao homem (TAVARES et al., 2012).

Quadro 1: Denominação atual e as diferentes denominações anteriores dos roedores.

Nomenclatura atual	Nomenclatura anterior	
<i>Necomys lasiurus</i>	<i>Zygodontomys lasiurus pixuna</i>	<i>Bolomys lasiurus</i>
<i>Calomys expulsus</i>	<i>Calomys callosus</i>	<i>Hesperomys tener</i>
<i>Cerradomys langguthi</i>	<i>Oryzomys subflavus</i>	—
<i>Pseudoryzomys spp</i>	—	—
<i>Euryoryzomys spp</i>	—	—
<i>Oecomys spp</i>	—	—
<i>Oligoryzomys stramieus</i>	<i>Oryzomys eliurus</i>	<i>Oligoryzomys eliurus</i>
<i>Holochilus sciureus</i>	—	—
<i>Oxymycterus spp</i>	—	—
<i>Wiedomys pirhorrohinus</i>	—	—
<i>Rattus rattus</i>	<i>Rattus rattus alexandrinus, Rattus rattus frugivorus, Rattus rattus rattus</i>	—
<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Cercomys cunicularis inermis</i>	<i>Thrichomys apereoides</i>
<i>Galea spixii</i>	<i>Galea spixii wellsi</i>	—

Figura 6: Principais roedores hospedeiros da peste no Brasil. **A.** *Necromys* sp.; **B.** *Calomys* sp.; **C.** *Oligoryzomys* sp.; **D.** *Cerradomys* sp.; **E.** *Galea* sp.; **F.** *Trychomys* sp.; **G.** *Rattus rattus*.



Fonte: Arquivos de Alzira Almeida/SRP.

Os focos de peste do Brasil estão localizados em duas áreas geográficas distintas e são denominados: o foco do Nordeste e o da Serra dos Órgãos. O foco do Nordeste estende-se pela zona semi-árida do estado do Ceará ao Norte de Minas Gerais. As áreas pestígenas estão situadas em regiões serranas: Serra da Ibiapaba e de Baturité (Ceará), Chapada do Araripe (Pernambuco, Ceará e Piauí), Chapada da Borborema (Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas), Chapada do Apodi (Rio Grande do Norte), Serra de Triunfo (Paraíba e Pernambuco), Planalto Oriental da Bahia, Chapada Diamantina, Piemonte da Diamantina, Planalto da Conquista e Serra do Formoso (Bahia), Vales do Jequitinhonha e do Rio Doce (Minas Gerais). O foco da Serra dos Órgãos localiza-se nos limites dos municípios de Nova Friburgo, Teresópolis e Sumidouro (Rio de Janeiro) (BRASIL, 2008) (Figura 7).

Apesar da incidência de casos humanos de peste ter declinado nos últimos anos nas áreas de foco, a persistência de anticorpos específicos para peste detectados em inquéritos sorológicos realizados nos animais sentinela, comprova a atividade pestosa na maioria deles, o que torna a zoonose uma ameaça real, uma vez que continuam persistindo condições precárias de vida para a maioria da população, sendo um problema atual e merecedor de atenção (TAVARES et al., 2012; ALMEIDA; TAVARES, 2015).

Figura 7: Áreas de peste no Brasil.



Áreas de focos de peste

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Serra da Ibiapaba | 8. Serra do Formoso |
| 2. Serra de Baturité | 9. Piemonte da Diamantina |
| 3. Chapada do Araripe | 10. Chapada Diamantina |
| 4. Chapada do Apodi | 11. Planalto de Conquista |
| 5. Serra do Triunfo | 12. Foco do Vale do Jequitinhonha |
| 6. Chapada da Borborema/Agreste | 13. Foco do Vale do Rio Doce |
| 7. Planalto Oriental da Bahia | 14. Serra dos Órgãos |

Fonte: BRASIL, 2008.

4.1.6 Formas Clínicas

A peste pode assumir diferentes formas clínicas dependendo da via de transmissão e do curso da infecção. A peste humana pode apresentar três formas clínicas mais frequentes: bubônica, septicêmica e pneumônica (Figura 8; 9), porém outras formas podem ocorrer, tais como a cutânea primária, a tonsilar, a faríngea, a endoftálmica e a meníngea, além da *pestis minor* ou peste ambulatória, que se apresenta com um quadro clínico oligossintomático, caracterizado clinicamente por manifestações gerais leves, adenopatia discreta e pouco dolorosa que tende à cura completa, constituindo uma forma atenuada da peste bubônica (BRASIL, 2008; ALMEIDA;TAVARES, 2015).

A forma bubônica é a mais comum, corresponde a 98% dos casos ocorridos no Nordeste brasileiro. Caracteriza-se pela reação inflamatória do linfonodo que constitui o sinal clássico da forma bubônica da peste (bubão) na região próxima da picada da pulga, extremamente doloroso. Ela tem um período de incubação de dois a seis dias e o doente apresenta sintomas como febre alta, calafrios, cefaléia, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos e dores generalizadas, com aparecimento do bubão no segundo ou terceiro dia após o início da infecção. Na ausência de diagnóstico precoce e tratamento adequados, a peste bubônica pode evoluir para a forma pneumônica (pneumonia pestosa secundária) e/ou septicêmica (BRASIL, 2008).

A peste septicêmica primária é caracterizada pela presença do bacilo no sangue e alguns pacientes (10-20%) podem desenvolver sepse sistêmica sem comprometimento evidente dos linfonodos, ou ser derivada da peste bubônica (peste septicêmica secundária) (BRASIL, 2005). Os sintomas são semelhantes aos de outras infecções sistêmicas, como febre alta, dor de cabeça, mal-estar, calafrios, distúrbios gastrointestinais, hemorragias cutâneas, mucosas, serosas e viscerais, além de trombozes que determinam necrose de extremidades, devido ao acúmulo do bacilo e de suas toxinas. A forma da doença é letal em 30 a 50% dos casos não tratados corretamente, podendo sobrevir o óbito após dois ou três dias de coma (BRASIL, 2008).

A forma mais grave da doença é a peste pneumônica, devido ao seu caráter extremamente contagioso, alta letalidade e a capacidade de provocar epidemias pela transmissão pessoa a pessoa (PERRY; FETHERSTON, 1997; ALMEIDA; TAVARES, 2015). A forma primária origina-se da inalação de aerossóis de *Y. pestis*, ou secundariamente aos casos de peste bubônica e septicêmica que não receberam a assistência devida. Apresenta um período de incubação muito curto (dois a três dias) e os sintomas são de rápida evolução, com febre alta acima de 40°C, calafrios, arritmias,

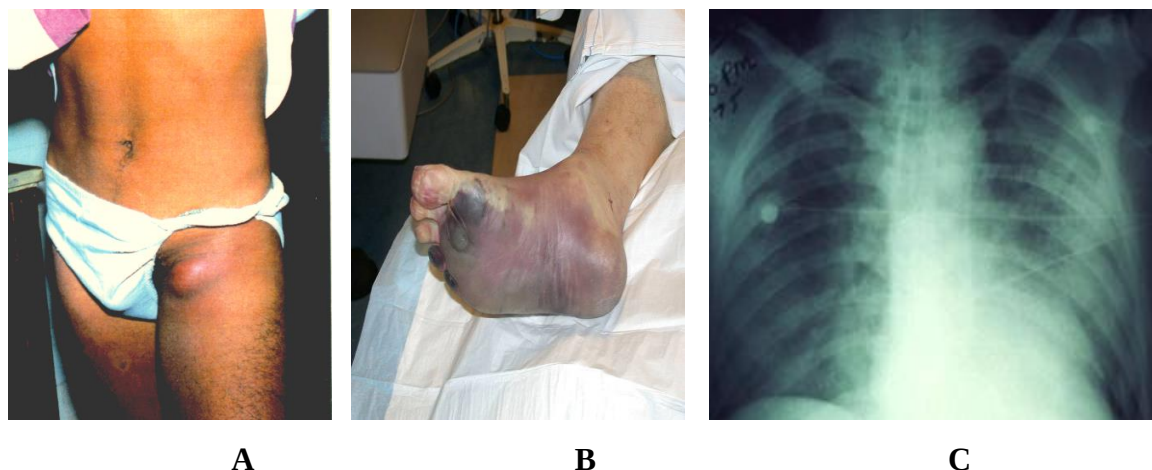
hipotensão arterial, náusea, vômitos e confusão mental. Os sintomas pulmonares podem piorar com posterior surgimento de dores no tórax, respiração curta e rápida, e expectoração sanguinolenta rica em bacilos pestosos. Na falta de tratamento adequado, pode ocorrer toxemia profunda, colapso cardiocirculatório, delírios constantes, coma e por fim o óbito (BRASIL, 2008; ALMEIDA; TAVARES, 2015).

Devido à severidade e a rápida transmissão da peste pneumônica, ela está listada como PHEIC (Public Health Emergency of International Concern), sujeita ao Regulamento Sanitário Internacional (RSI) (STENSETH et al., 2008; WHO 2008). No Brasil, consta na Lista de Notificação Compulsória (LNC), entre as doenças, agravos e eventos de importância para a saúde pública de abrangência nacional em toda a rede de saúde, pública e privada (Portaria Nº 1.271/2014-MS). Diante dessa classificação, é obrigação dos serviços de saúde a identificação precoce dos pacientes e contatos em até 48 horas após notificação, para acionamento imediato de medidas adequadas de controle e limitar sua disseminação.

Segundo o procedimento padronizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) todos os casos notificados de peste são investigados e os dados são registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A Assistência básica consiste pelo atendimento dos pacientes e coleta de duas amostras de sangue para exames sorológicos (a primeira na fase aguda e a segunda após duas a três semanas), essas são enviadas ao laboratório para diagnóstico, acompanhadas pela Ficha de Investigação de Caso Humano de Peste do Sistema de Informação Nacional de Peste (SISPESTE) (TAVARES et al., 2012) (Figura 10).

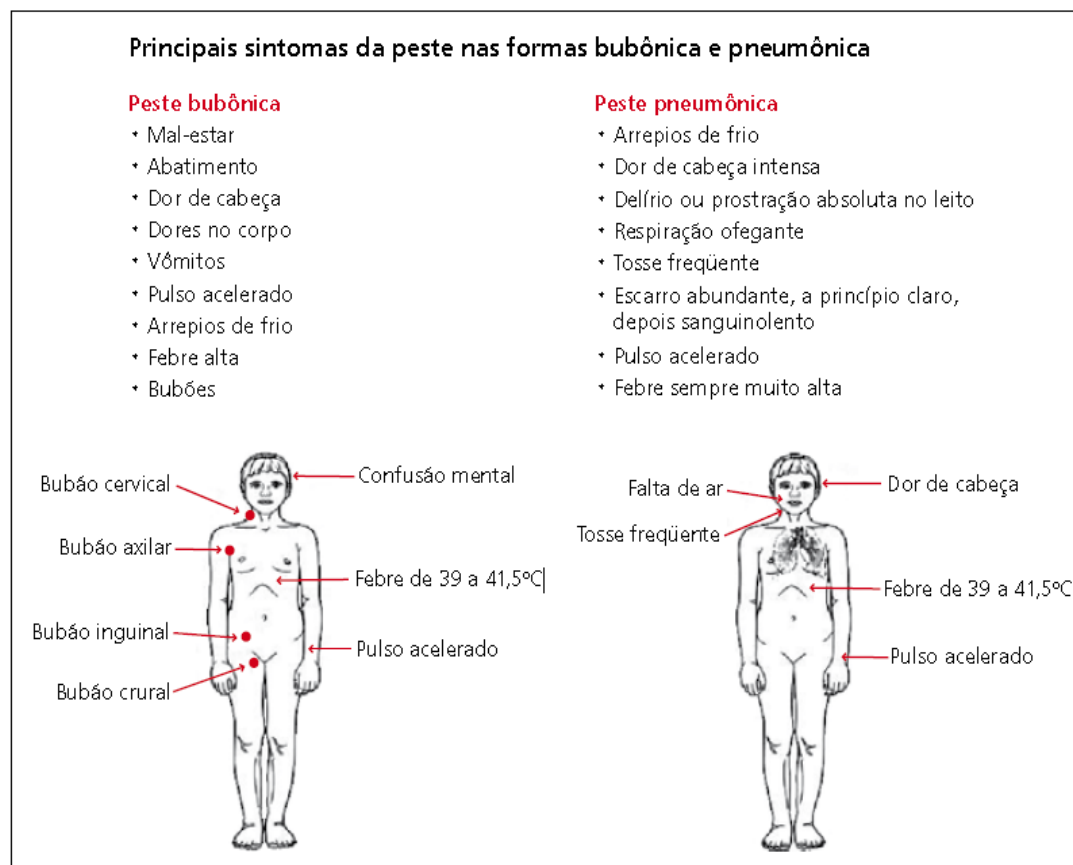
O diagnóstico da peste é realizado nos laboratórios credenciados pela SVS/MS, os Laboratórios Centrais Estaduais (LACEN) dos estados com áreas focais e no Serviço de Referência Nacional para a Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da FIOCRUZ (CPqAM/FIOCRUZ-PE).

Figura 8: Pacientes acometidos com as três principais formas clínicas da peste. (A) Forma bubônica; (B) Forma septicêmica; (C) Forma pneumônica.



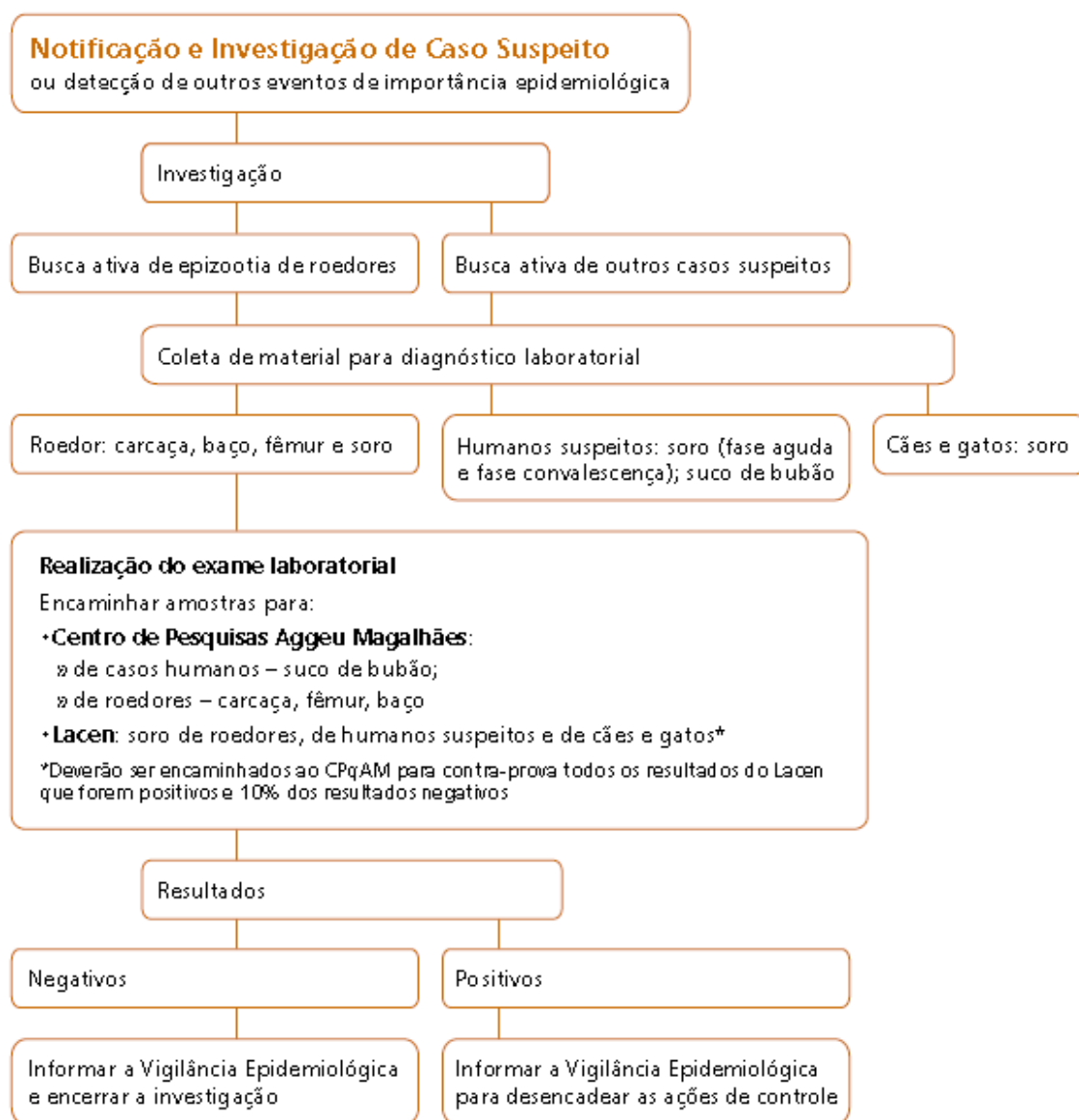
Fonte: A: Arquivos de Alzira Almeida/SRP; B e C: <http://www.cdc.gov>.

Figura 9: Perfil diferencial nas manifestações clínicas da peste (bubônica e pneumônica).



Fonte: BRASIL, 2008.

Figura 10: Fluxograma de investigação de caso suspeito.



Fonte: BRASIL, 2008.

4.1.7 Tratamento

O tratamento da doença deve ser precoce e intensivo devido à gravidade e a rapidez da evolução da infecção, visando deter a bacteriemia e a superar a toxemia. Consiste basicamente no uso de antibióticos específicos e tratamento de suporte eficiente. Nos EUA, o Centro de Controle de Doenças (CDC) recomenda que o paciente permaneça estritamente isolado durante as primeiras 48 horas do tratamento, pelo risco de pneumonia, forma altamente contagiosa (BRASIL, 2008; ALMEIDA; TAVARES, 2015). A equipe de saúde deve adotar as medidas de biossegurança compatíveis com o caso, das universais na peste bubônica ao isolamento estrito na suspeita de pneumonia.

A *Y. pestis* é sensível à maioria dos antimicrobianos, com exceção aos betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, etc.), macrolídeos (eritromicina, claritromicina, roxitromicina e miocamicina) e azalídeos (azitromicina), que são ineficazes para o tratamento da peste e podem elevar o risco de complicações (BRASIL, 2008).

Desde 1946, as drogas de eleição para tratamento da peste são a estreptomicina ou gentamicina, mas uma série de outros antibióticos também é eficaz, como é o caso das tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas e fluoroquinolonas. A estreptomicina é considerada o padrão-ouro no tratamento da peste e é uma indicação formal nos casos de peste pneumônica, apesar de sua pouca disponibilidade no mercado (ALMEIDA; TAVARES, 2015). Vale ressaltar que esses antibióticos são eficazes quando a infecção é diagnosticada precocemente e o tratamento se inicia prontamente. Na forma bubônica menos de 30% dos pacientes sobrevivem quando a infecção não é rapidamente diagnosticada e tratada adequadamente, como também pacientes de peste pneumônica que não recebem antibióticos dentro de 18h do aparecimento dos sintomas respiratórios, geralmente não sobrevivem (WHO, 1999).

Recomenda-se o uso da estreptomicina em associação com a tetraciclina ou com o cloranfenicol, principalmente para a terapia profilática e tratamento da meningite causada por *Y.pestis*. A gentamicina é uma excelente opção terapêutica em quaisquer situações, apresenta maior disponibilidade no mercado e é eficaz por via intramuscular e intravenosa, ainda sendo indicada para tratamento de gestantes e crianças (BRASIL, 2008; ALMEIDA; TAVARES, 2015).

Há dois relatos em 1995 de cepas de *Y. pestis* multirresistentes às drogas, isoladas de pacientes em Madagascar e registro de cepas resistentes as quinolonas na Rússia (INGLESBY et al., 2000; GALIMAND et al., 1997). A *Y. pestis* pode ter adquirido esta resistência, através de plasmídios de resistência, no organismo das pulgas ou no tubo digestivo dos ratos (*Rattus sp.*), que

sendo onívoros, convivem em ambientes contaminados com material fecal humano com flora resistente a antibióticos.

4.1.8 Controle e Prevenção

A vigilância da peste no Brasil está baseada no rastreamento da infecção nas áreas focais. Desde 2008, há uma tendência a se restringir esse rastreamento à sorologia canina (ALMEIDA; TAVARES, 2015). Determinadas ações são desenvolvidas para reduzir o contato da população com as possíveis fontes de infecção da natureza, como também evitar a exposição de doentes com pneumonia pestosa. Dentre elas, estão a informação continuada, educação e comunicação (IEC), meios importantes para que a população em geral tome conhecimento da gravidade da peste, do seu ciclo epidemiológico e que seja orientada como evitar a exposição a situações de risco; Utilização de medidas padrão de biossegurança no manuseio de animais e materiais contaminados; Avaliação sistemática das atividades desenvolvidas, podendo determinar os possíveis riscos de epizootias.

Outras medidas essenciais incluem o saneamento ambiental para eliminar fontes de alimentos de roedores, destruição de abrigos e o uso apropriado de inseticidas (pulgas) e constante monitoramento da população desses animais (BRASIL, 2008). A vigilância contínua das áreas de foco, identificação e tratamento precoce de casos humanos, quimioprofilaxia (tetraciclinas ou fluoroquinolonas), notificação e intercâmbio com as organizações internacionais de saúde e a vigilância nos portos e aeroportos internacionais, são fundamentais, dentre outras medidas, para reduzir a letalidade e impedir a ocorrência de epidemias de peste.

A imunização ativa é um procedimento pouco utilizado durante surtos humanos, uma vez que não confere uma resposta imunitária protetora em curto prazo, é pouco eficaz contra a peste bubônica e não protege contra a pneumônica primária, a exemplo de uma vacina originada de linhagens mortas de *Y. pestis* que foi usada de 1890 até 1999, a mesma não apresentava proteção eficiente, podendo induzir ao vacinado uma falsa sensação de proteção, o que pode levar a exposição de risco (RUSSEL et al., 1995; WHO, 1999).

A vacina desenvolvida em 1936 por Girard e Robic utilizando uma linhagem atenuada da bactéria (cepa EV76/Pgm-), apesar de proteger contra a forma bubônica da doença, é pouco eficaz contra a forma pneumônica, além de produzir sérios efeitos colaterais e seu uso foi descontinuado (RUSSEL et al., 1995). Estudos estão em andamento sobre o potencial de novas vacinas recombinantes, utilizando subunidades da *Y. pestis*, como os antígenos LcrV e F1.

4.1.9 Diagnóstico da peste

Diagnosticar a peste precocemente é muito importante para evitar o óbito do paciente, como também para implementação de medidas adequadas que evitem ocorrência de epidemias. A notificação do caso ou surto à autoridade sanitária competente deve ser imediata, e o conhecimento profundo dos profissionais de saúde sobre a nosologia regional, é essencial para a confirmação clínica-epidemiológica da peste ou descarte do caso (BRASIL, 2008).

4.1.9.1 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico específico da peste é de extrema importância para a vigilância epidemiológica. A sintomatologia da doença pode ser confundida com outros agravos. Faz-se diagnóstico diferencial com as adenites por estreptococos ou estafilococos, linfogranuloma venéreo, sífilis, toxoplasmose, tifo, mononucleose infecciosa, tularemia, filariose linfática, leptospirose, dengue, rickettsioses, tuberculose, febre tifoide, neoplasias, hérnias estranguladas e septicemias usualmente por bactérias gram-negativas ou inespecíficas (PERRY; FETHERSTON, 1997; BRASIL, 2008). No oeste dos EUA, os primeiros casos diagnosticados da SCPH (Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus) foram inicialmente confundidos com peste pneumônica, uma vez que ocorreram em área focal de peste, o que confere uma importância ainda maior ao diagnóstico diferencial dessa forma clínica.

4.1.9.2 Diagnóstico laboratorial

Os exames específicos no diagnóstico laboratorial da peste são realizados por técnicas bacteriológicas, com identificação e isolamento da bactéria, sorológicas com detecção de anticorpos antipestosos e as técnicas moleculares que têm sido desenvolvidas para o diagnóstico da peste em material clínico ou animal. Devem-se obter distintos materiais nas diversas formas da doença para os testes diagnósticos, por exemplo, aspirado do linfonodo e sangue na peste bubônica; esputo na pneumônica, hemocultura na septicêmica e em casos de peste meningéa, coleta de sangue e do líquido cefalorraquidiano (LCR). É importante enfatizar que as amostras para exames devem ser coletadas antes do início do tratamento com antibióticos (CHU, 2000; BRASIL, 2008; ALMEIDA; TAVARES, 2015).

4.1.9.2.1 Bacteriologia

As análises são realizadas utilizando amostras de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica dos humanos; ou ainda sangue e fragmentos de vísceras de roedores ou macerados de pulgas (CHU, 2000). Amostras para o diagnóstico bacteriológico de peste podem ser conservadas no meio de conservação e transporte de Cary & Blair, onde a *Y. pestis* se mantém viável durante várias semanas à temperatura ambiente (BRASIL, 2008).

Exame direto

O exame direto é realizado em esfregaços de sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, esputo nos humanos, baço, medula óssea e fígado de roedores ou outros animais, corados por qualquer dos métodos; coloração de Gram, corante de Wayson ou coloração por azul de metileno (azul de Löffler). O método de Gram permite verificar se a bactéria é Gram positiva/negativa), contudo o corante de Wayson e o azul de metileno detalham melhor o aspecto bipolar da bactéria, facilitando a identificação, exceto em amostras multicontaminadas (BRASIL, 2008).

Imunofluorescência direta

A imunofluorescência direta (ID) é uma técnica de diagnóstico que se baseia na reação antígeno-anticorpo empregando anticorpos conjugados com material fluorescente (isotiocianato de fluoresceína - FITC) para pesquisa de F1 de *Y. pestis*, que pode ser detectada em aproximadamente duas horas após o recebimento do material suspeito (esfregaços de cultura e material de origem humana ou animal). A presença dos bacilos pestosos pode ser demonstrada mesmo em material já em decomposição, tais como a medula óssea de cadáveres e as carcaças de animais, do qual não se pode isolar a bactéria pelos procedimentos usuais (CHU, 2000). O teste tem como desvantagem seu nível de especificidade, pois têm sido observados resultados falsamente positivos em presença da *Y. pseudotuberculosis* e falsamente negativos para cepas de *Y. pestis* deficientes em F1. É uma prova que deve ser usada apenas para o diagnóstico presuntivo da doença (BRITO et al., 1989).

Cultura

As diversas amostras de material humano, de animais ou de pulgas são semeadas em duas placas de gelose peptonada (*Blood Agar Base* = BAB), pH na faixa de 7,4 a 7,6 e a temperatura ideal para o crescimento de 28°C. O crescimento é lento e após 48hs as colônias são pequenas, translúcidas, brilhantes e possuem a particularidade de serem deslocadas sem nenhuma alteração morfológica com a alça de platina. Depois do semeio, em uma das placas, instila-se uma gota do bacteriófago. A ação de lise provocada pelo fago pode ser percebida dentro de 18 a 24 horas, mas as colônias de *Y. pestis* só tomam seu aspecto característico após 48/72 horas de incubação (Figura 11) (BRASIL, 2008).

No caso do sangue, o cultivo é feito em caldo BHI-*brain heart infusion* (Hemocultura: 1 ml de sangue, em 10 ml de BHI), sob as mesmas condições de temperatura e pH utilizados para cultura em BAB. O crescimento após 24 a 48 horas apresenta aspecto flocular sem turvação do meio (CHU, 2000). Para o isolamento em placa do bacilo, a partir da hemocultura, segue procedimento descrito acima. O diagnóstico por cultura pode ser prejudicado por procedimentos inadequados de transporte e conservação, que podem causar dissecação, morte da bactéria ou contaminação das amostras acarretando resultado falso negativo (LEAL; ALMEIDA, 1999).

Figura 11: Teste do bacteriófago. Destaque para a lise provocada pela ação do fago antipestoso.



Fonte: BRASIL, 2008.

Teste rápido para pesquisa de F1 (fita reagente)

Um teste simples e rápido tipo fita reagente foi desenvolvido pelo Instituto Pasteur de Madagascar, com base em uma reação imunocromogênica, o qual utiliza anticorpos monoclonais, anti-F1 imobilizados junto a uma substância cromógena em membranas de nitrocelulose. É realizado com a imersão da fita em amostras de sangue, esputo e aspirado de bubão de pacientes. A sua principal vantagem é que pode ser realizado na residência do paciente, sem necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal especializado. Entretanto este teste ainda não está disponível comercialmente em todos os locais onde se necessita de testes rápidos para diagnóstico (CHANTEAU et al., 2001).

4.1.9.2.2 Molecular

As técnicas moleculares apresentam a vantagem de dispensar o cultivo das amostras e são exequíveis mesmo quando as bactérias estão inviáveis. Diversos protocolos baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction) e suas variações (Multiplex-PCR, Nested-PCR, N-PCRTbU, LAMP,

real-time PCR) foram desenvolvidos para diagnóstico da peste, com alvo na identificação da bactéria e caracterização dos fatores de virulência das culturas diretamente das amostras biológicas obtidas de humanos e outros animais (LEAL et al., 1996; LEAL; ALMEIDA, 1999; SOUZA et al., 2007; NUNES et al., 2014).

PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), baseia-se na amplificação *in vitro* de segmentos específicos de DNA, permitindo um rápido diagnóstico em diversas doenças bacterianas, virais, parasitárias e hereditárias (ERLICH et al., 1991).

A PCR consiste de três etapas fundamentais que correspondem a um ciclo da reação: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento dos *primers* e extensão, com auxílio da enzima *Taq DNA polimerase*. Cada etapa é realizada a uma temperatura diferente e os ciclos ocorrem repetidas vezes. No final do processo a quantidade desejada do DNA-alvo é alcançada permitindo sua visualização por um método adequado através da técnica de eletroforese (ERLICH et al., 1991).

A PCR mostrou-se útil na identificação da bactéria em amostras recentes assim como para análise de amostras antigas, como o caso de material genético de *Y. pestis* identificado em amostras arqueológicas (RAOULT et al., 2000).

Multiplex-PCR (M-PCR)

A Multiplex-PCR é uma variação da PCR convencional na qual são utilizados múltiplos pares de *primers* dirigidos a diferentes alvos, numa mesma reação. Essa técnica foi padronizada para o diagnóstico de peste diretamente do sangue dos pacientes, sem prévio isolamento da bactéria ou extração de DNA, com *primers* direcionados aos genes: *irp2*, presente na ilha de patogenicidade cromossomal; *caf1*, *lcrV* e *pla*, presentes respectivamente nos plasmídeos pFra, pYV e pPst (LEAL; ALMEIDA, 1999).

Nos diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil, foram encontradas cepas atípicas faltando algum plasmídeo ou contendo plasmídeos adicionais (LEAL et al., 1997; 2000). A M-PCR se torna então importante, principalmente para estudos epidemiológicos, pois além do diagnóstico ela permite também a caracterização dos fatores de virulência clássicos das cepas de *Y.*

pestis. Mostrou-se útil também para estudos retrospectivos, de um surto de peste no estado da Paraíba (MELO et al., 2003).

A Multiplex-PCR revelou-se eficaz na detecção de *Y. pestis* em amostras de pulgas conservadas em álcool 70%. O procedimento não permite o cultivo da bactéria, mas confere segurança para o seu uso em campo, pois diminui os riscos da manipulação de pulgas infectadas.

Nested-PCR

A técnica Nested-PCR (N-PCR) é uma variação da PCR adotada para melhorar a sensibilidade e especificidade da PCR (ERLICH et al., 1991). O procedimento é realizado em duas etapas de amplificação: na primeira é utilizado um par de *primers* com homologia a uma região mais externa ao alvo e posteriormente, os amplicons gerados na primeira reação servem como molde para a segunda etapa que utiliza *primers* dirigidos a uma região mais interna ao primeiro produto. A reamplificação do produto aumenta a sensibilidade da técnica, no entanto, durante a transferência dos amplicons-molde para o microtubo da segunda reação, podem ocorrer contaminações que podem alterar o resultado real (ERLICH et al., 1991).

A N-PCR foi adaptada para uso em baço de roedores sem extração prévia de DNA, tendo como alvo de amplificação o gene *caf1* que codifica as unidades estruturais do antígeno F1 da *Y. pestis* (LEAL et al., 1996). Enquanto na PCR convencional o limiar de detecção é de 100pg de DNA e 2000 unidades formadoras de colônia (UFC), para N-PCR o limiar de detecção é de 1pg de DNA e 2 UFC (SOUZA et al., 2007), mostrando então o quanto a N-PCR é mais sensível que uma PCR simples.

Nested-PCR em tubo único (N-PCRTbU)

A N-PCRTbU é uma variação do N-PCR adaptada para minimizar riscos de contaminação durante a transferência dos amplicons entre as etapas de amplificação no N-PCR (ABATH et al., 2002). Nesta técnica, os dois pares de *primers*, internos e externos são adicionados ao mesmo tubo sem a necessidade de abertura do tubo entre as fases de amplificação. Para evitar a competição entre os pares de *primers* permitindo que eles atuem em momentos distintos, são propostas duas alternativas: uma delas é usar diferentes temperaturas de anelamento para cada par de *primers* (YLITALO et al., 1995; GOOKIN et al., 2002).

Abath et al., (2002) desenvolveram para o diagnóstico da esquistossomose uma N-PCRTbU, com a estratégia de fixar os *primers* internos na face interna da tampa do microtubo, por evaporação. Enquanto os *primers* externos são adicionados no fundo do tubo junto com os demais reagentes, a mistura de reação com os *primers* externos é introduzida no interior do tubo e ao final da primeira etapa de amplificação o tubo é invertido várias vezes de modo que o *primer* fixado na tampa dissolva-se no produto da primeira reação. Uma grande vantagem desta técnica é que minimiza o manuseio do DNA, diminuindo a possibilidade de contaminação.

Essa técnica foi padronizada para o diagnóstico da peste em amostras biológicas obtidas de animais experimentais conservadas por até 11 meses no meio de Cary-Blair e em amostras contaminadas por outras bactérias com os dois pares de *primers* direcionados ao gene *caf1* da *Y. pestis* (SOUZA et al., 2007).

Além de revelar boa sensibilidade e especificidade, os resultados podem ser obtidos em menos de 24 horas, tornando a N-PCRTbU mais uma opção em situações emergenciais nas quais a rapidez no diagnóstico é fundamental para adoção de medidas imediatas de controle.

LAMP

A tecnologia de *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) é uma variação de PCR, que ocorre numa temperatura constante utilizando a enzima polimerase Bst e um conjunto de quatro a seis iniciadores. Os iniciadores são concebidos especificamente para amplificar seis a oito regiões no gene alvo. O resultado desta técnica é visualizado diretamente no tubo de teste a olho nu, dispensando assim a necessidade de um termociclador e eletroforese. Nunes et al., (2014) padronizaram a técnica para amplificação do gene *caf1* da *Y. pestis* diretamente das amostras, e outros ensaios estão em andamento para que o LAMP venha a ser implementado na rotina de diagnóstico da peste, especialmente em situações de emergência.

4.1.9.2.3 Sorologia

Hemaglutinação passiva (HA)

A Hemaglutinação passiva (HA) consiste na determinação qualitativa e/ou quantitativa de anticorpos antipestosos, contra a proteína capsular da *Y. pestis* (fração antigênica 1 ou F1). Há várias décadas a prova de hemaglutinação passiva (HA) vem sendo usada em áreas focais de todo

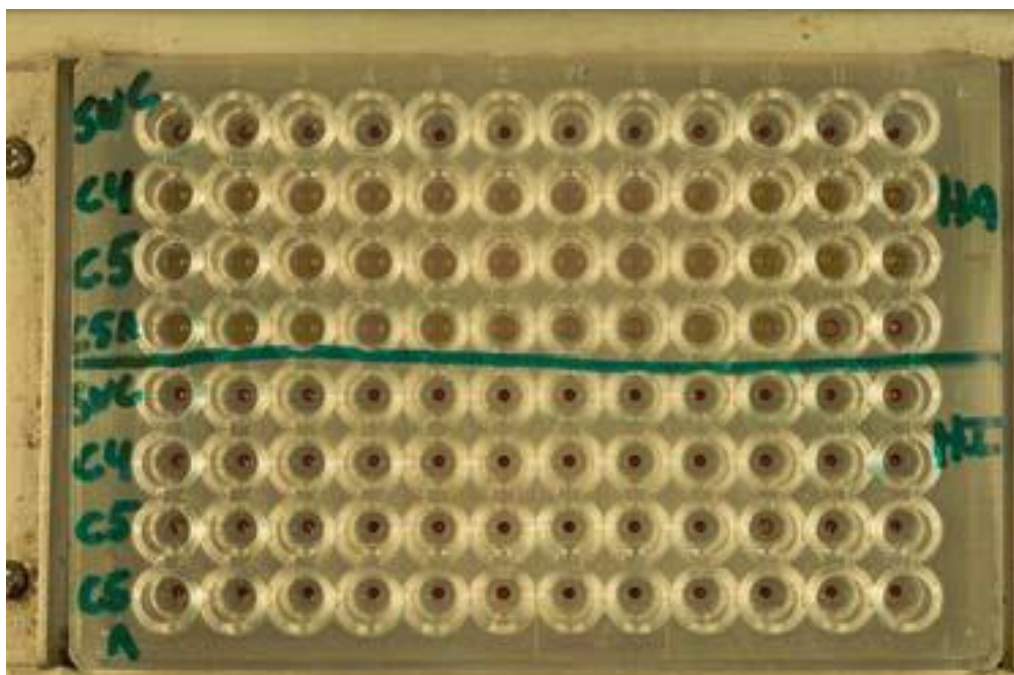
mundo, no diagnóstico e vigilância da peste humana e em animais. Realizada com hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno F1, a especificidade do teste é controlada pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI). Apesar de ser usada em larga escala no diagnóstico da peste, essa técnica apresenta algumas dificuldades: complexidade, emprego de reagentes perecíveis e baixa sensibilidade. Normalmente em humanos, a soroconversão ocorre dentro de uma a duas semanas do início dos sintomas, em alguns mais cedo (cinco dias) e outros não a fazem (ALMEIDA et al, 1989; ARAGÃO et al., 2002).

A HA/HI permite identificar a presença da infecção em áreas onde não existe evidência de epizootia por meio da detecção de anticorpos no soro de roedores, principalmente nas espécies resistentes à infecção pela *Y. pestis* ou nos animais sentinelas/indicadores. Os anticorpos contra a *Y. pestis* podem ser detectados a partir do quinto dia da infecção e permanecem detectáveis no homem por vários anos e nos cães e gatos por aproximadamente trezentos dias. A notificação dos pacientes suspeitos é realizada com base na data do aparecimento dos primeiros sintomas, mas no caso dos animais, a notificação é feita pela data de coleta de material, pois para eles não se pode precisar a data da infecção. Entretanto, as variações quantitativas fornecem indicações, e considera-se que um título HA alto ($>1/64$) corresponde a uma infecção recente (BRASIL, 2008).

O título da amostra é encontrado considerando a diferença entre o número de poços com aglutinação e o de poços com inibição (aglutinação específica), que pode variar de $1/4$ (negativo) a $1/8192$ (positivo). Porém, a partir de três poços com aglutinação específica ($1/16$), considera-se positividade da amostra (Figura 12).

As reações inespecíficas, muito comuns nos cães, podem estar relacionadas ao estado do animal (saúde, dieta, alergias), problemas ligados à coleta, transporte e estocagem das amostras.

Figura 12: Teste de hemaglutinação (HA/HI) em placas de microtitulação de 96 poços em “U”.



Legenda:  Hemaglutinação;  Inibição da hemaglutinação

Fonte: BRASIL, 2008.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Princípios e generalidades

Os testes imunoenzimáticos do termo em inglês “*Enzyme immunoassay*” (EIA/EIE) ou “*Enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA) se baseiam em propriedades de duas moléculas biológicas, o anticorpo e a enzima. Esses testes foram desenvolvidos em 1971, pelos grupos de pesquisa de Perlmann e Engvall, da Universidade de Estocolmo, e pelo grupo de Schuurs e Bauke (ENGVALL; PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN; SCHUURS, 1974).

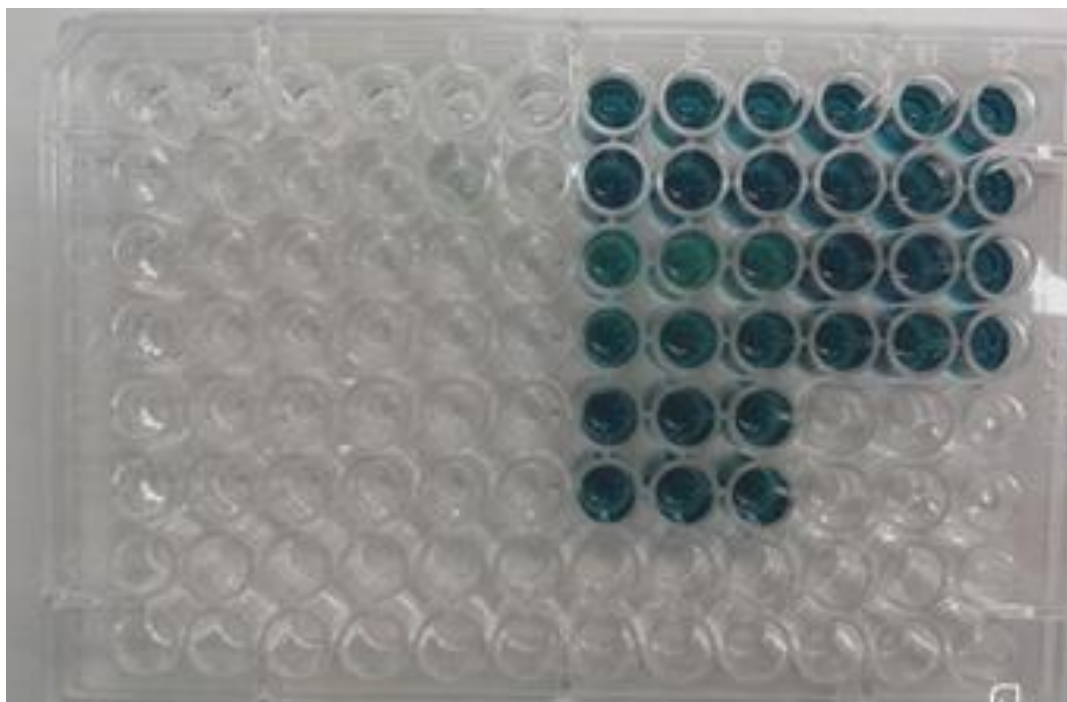
O princípio do ELISA consiste de uma reação imunológica em que o anticorpo reconhece e se liga a antígenos específicos, onde a enzima “peroxidase”, catalisadora de reações químicas, pode ser detectada pela adição de substrato (DAVIS et al., 1990; PAULIE et al., 2005). O ensaio se inicia

com antígenos ou anticorpos primários (dependendo do método empregado) adsorvidos a uma fase sólida, que usualmente são placas de microtitulação de fundo achatado com 96 poços, sendo constituídas de poliestireno, um material que contribui para uma boa condutividade das ligações covalentes entre os imuno-reagentes e o material plástico, pois facilita no momento da separação dos componentes ligados à placa e das “substâncias livres”, como também a transparência ótica que ajuda a leitura através da placa. A escolha da qualidade das placas é de extrema importância para os resultados das reações (VOLLER et al., 1979; BUTLER, 2000; PAULIE et al., 2005).

Em seguida, a superfície é lavada com uma solução tampão de bloqueio que servirá para impedir que proteínas não específicas adsorvam nessas superfícies e influencie no passo seguinte do teste. Posteriormente, a amostra que pode conter antígeno ou anticorpo é adicionada a placa, no qual substâncias não ligadas serão desprezadas pela próxima lavagem, e à superfície é adicionado anticorpos ou antígeno ligados a uma enzima que na presença de um substrato cromogênico desenvolve cor. A enzima mais comumente utilizada nestas provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O mais O_2 .

A intensidade da cor é proporcional à concentração do antígeno ou do anticorpo de interesse. Existe uma grande variedade de compostos que podem ser utilizados como cromóforos, fornecendo as mais variadas cores, utilizáveis na técnica de ELISA, sendo o ABTS (2, 2'-azino-di(3 ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) um exemplo de corante que se torna verde-azulado na presença de peroxidase (Figura 13). Normalmente a reação é interrompida adicionando-se uma solução bloqueadora (H_2SO_4 , NaF, SDS etc.). Ao final, os resultados são colhidos por espectrofotometria (Expressos em unidades de absorbância a um raio de luz) em um filtro de revelação específico (DAVIS et al., 1990).

Figura 13: Microplaca de poliestireno de 96 poços, fundo chato, destacando as amostras positivas de coelho nos poços coloridos de azul (reação substrato/enzima), com o cromógeno ABTS e as amostras negativas à esquerda na ausência de coloração.

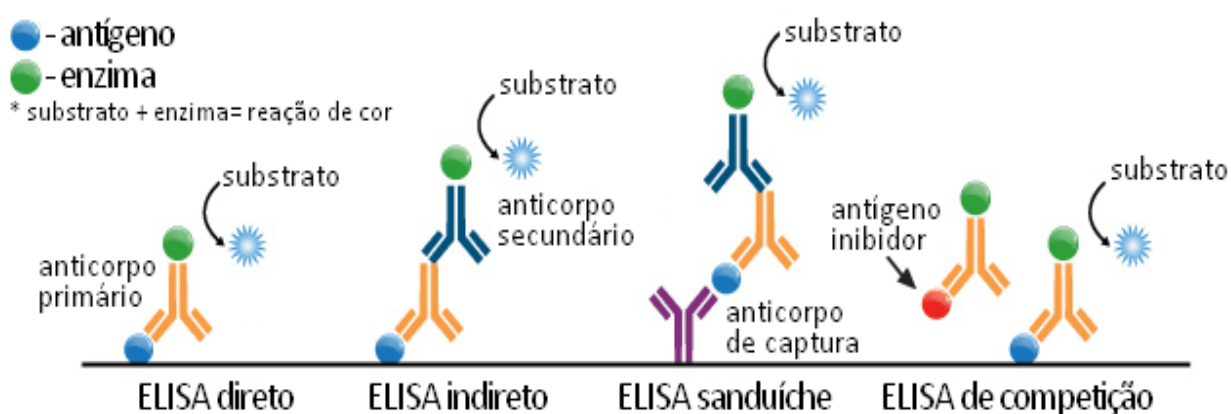


Legenda:  amostra positiva(cor);  amostra negativa(incolor)

Fonte: Arquivos de Érika CV Costa.

Há várias modalidades do ELISA: ELISA direto, indireto, competitivo, duplo sanduíche e etc (Figura 14). O ELISA indireto é um ensaio amplamente utilizado com finalidade de identificar, inclusive quantificar anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno ou anticorpo adsorvido à placa. Neste, utilizam-se duas imunoglobulinas G (IgG), uma para reconhecimento do antígeno (1º anticorpo) e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará (2º anticorpo) (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Figura 14: Esquema das modalidades do ELISA.



Fonte: <http://www.biomedicinapadiao.com.br/2010/05/elisa.html>

Entre os testes sorológicos disponíveis, os avanços na técnica de ELISA e seu uso para diagnóstico de diversas doenças vêm aumentando gradativamente, graças à sua elevada especificidade e sensibilidade, além de poder ser adaptado tanto a testes simples como à automação sofisticada, resultados de natureza quantitativa, possibilidade de rápida execução diagnóstica, apresenta baixo nível de risco biológico e não depende de um segundo fenômeno como precipitação, aglutinação ou fixação do complemento. Essas características ampliaram sua utilização em muitas espécies animais e em estudos epidemiológicos (PAULIE et al., 2005).

Matrizes alternativas

Visando aperfeiçoar o diagnóstico da peste, diversos protocolos foram desenvolvidos com sucesso, utilizando novas matrizes alternativas comerciais ou sintetizadas *in house* para substituição às hemácias de carneiro: composto Polysiloxane/PVA-Glutaraldehyde, micropartículas de PVA/GA (Álcool Polivinílico/Glutaraldeído). As micropartículas de PVA/GA são estáveis e de baixo custo, sendo uma vantagem em relação às hemácias de carneiro (ALMEIDA; FERREIRA, 1992; MONTENEGRO et al, 1993; CARVALHO-JR et al, 1996; ARAÚJO et al, 1996; 1998; BARBOSA et al, 2000; 2001; LIMA-BARROS et al, 2002). A utilização dessas matrizes apresenta a vantagem da redução das reações inespecíficas que ocorrem quando se utilizam as hemácias, mas têm a mesma exigência do ELISA convencional, quanto à utilização de diferentes anticorpos espécie-específico nos experimentos. Sendo assim, o HA continua sendo o teste mais usado no diagnóstico e vigilância da peste no Brasil.

Utilização da proteína A

Os testes imunoenzimáticos, a exemplo o ELISA para detecção de IgM ou IgG e para a captura do antígeno F1, apesar de sua sensibilidade e especificidade, tem como desvantagem a necessidade de empregar diferentes anticorpos espécie-específicos nos testes com soros humanos, de roedores, cães, gatos etc. Entretanto, outras alternativas de conjugados polivalentes com afinidade com essas variedades de anticorpos, têm sido estudadas e utilizadas em muitos desses testes.

Como exemplo a proteína A, uma proteína de superfície, sendo encontrada na parede celular da maioria das amostras de *Staphylococcus aureus*, caracterizada e estudada primeiramente por Jensen em 1959. Nos testes imunoenzimáticos participa como componente conjugado “Protein A-Peroxidase *Staphylococcus aureus* /horseradish”. É composta por uma cadeia polipeptídica com peso molecular em torno de 58 mil Daltons, sendo responsável pela interação com a porção Fc (Fragmento c) da molécula de IgG (GOUDSWAARD et al., 1978).

Um ensaio imunoenzimático utilizando como conjugado a Proteína A pode ser aplicado em soros originados de humanos, mamíferos domésticos e selvagens e apresenta importantes vantagens sobre o uso de conjugados anti-IgG específicos, pois é uma proteína polivalente que possui uma boa

afinidade com IgG desses animais. Estudos vêm sendo realizados e demonstram excelentes resultados com o uso da mesma, diante de outros conjugados convencionais (GOUDSWAARD et al., 1978; RASOAMANANA et al., 1997; LIMA et al., 2005; FERREIRA et al., 2013).

5. REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C et al. Single-tube Nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Westborough, v. 33, p. 1210-1214, 2002.
- ACHTMAN et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. **PNAS**, v. 101, p. 17837-17842, 2004.
- ALMEIDA, A. M. P. et al. Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 249-256, 1989.
- ALMEIDA, A. M. P.; FERREIRA, L. C. S. Evaluation of three serological tests for the detection of human plague in northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, p. 87-92, 1992.
- ALMEIDA, A. M. P; TAVARES, C. Peste. In: VERONESI-FOCACCIA. **Tratado de Infectologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 61, 2015. 1315-1329 p
- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia. Brasília/Fortaleza: **Publicação SBF**, 2001.
- ANISIMOV, A.P.; LINDLER, L.E.; PIER, G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, p. 434-464, 2004.
- ARAGÃO, A. I. et al. Vigilância da peste no estado do Ceará: 1990-1999. **Rev Soc Bras Med Trop** São Paulo, v. 35, p. 143-148, 2002.
- ARAÚJO, A. M et al. The use of polyvinil alcohol glutaraldehyde as solid phase in ELISA for plague. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 91:195-198, 1996.
- ARAÚJO, A.M. et al. Rapid ELISA for plague. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p-111-112, 1998.
- BARBOSA, A.D. et al. Cellulose acetate as solid phase in ELISA for plague. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95:95-96, 2000.
- BARBOSA, G.H.T.S. et al. The use of filter paper plasticized with polyvinil alcohol glutaraldehyde in ELISA. **Braz J Med Biol Res**. 33:823-827, 2001.
- BONVICINO, C.R. et al. A taxonomic update of small mammal plague reservoirs in South America. **Vec B Zoon Dis**. 15 (10), p. 571-579, 2015.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: [recurso eletrônico]**, Brasília DF: **Ministério da Saúde**. ed. 1, atual, p. 773, 2016.

Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf>
Acesso em: 17 jan 2017.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle de Peste**, Brasília DF: Ministério da Saúde. (Série A: Normas e Manuais Técnicos). 2008.

BRITO, M.E.F. et al. Emprego do teste de imunofluorescência no diagnóstico da peste (infecção pela *Yersinia pestis*) nos focos do Nordeste do Brasil. **Rev. Microbiol.** São Paulo. 20:446-451, 1989.

BUTLER, J. E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J Immunoassay**, 21:2-3, p. 165-209, 2000.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microb infect**, Paris, v. 3, p. 561- 569, 2001.

CARNIEL, E. Pathogenic *Yersinia*: stepwise gain of virulence due to sequential acquisition of mobile genetic elements. In: HENSEL, M.; SCHMIDT, H. **Horizontal gene transfer in the evolution of pathogenesis**. Cambridge: University Press, cap. 8, 2008. 193-216 p.

CARVALHO-JR, L.B. et al. The use of polyvinil alcohol glutaraldehyde antigen coated discs for laser induced fluorescence detection of plague. **Sensors and Actuators**. B. 35-36:1-4, 1996.
 CDC/CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Atlanta). **Plague**. Disponível em: < <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp>> **Acesso em:** 3 nov. 2015.

CHANTEAU, S. et al. Um nouveau test de diagnostic rapide et simple de la peste. **ICEPID 4**. Marseille, 2001.

CHU, M. Laboratory manual of plague diagnosis tests. **World Health Organization**. Geneve, p. 129, 2000.

CORNELIUS, C.; QUENEE, L.; ANDERSON, D.; SCHNEEWIND, O. Passive immunity against plague. In: PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. The Genus *Yersinia*: From genomics to function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer. v. 603, p. 415-424, 2007.

DAVIS, D.R., PADLAN, E.A, SHERIFF, S. Antibody-antigen complexes. **Annu Rev Biochem**, 59, 439-473, 1990.

DEVIGNAT, R. Geographical distribution of three species of *Pasteurella pestis*. **Schweizerische Zeitschrift für Pathologie und Bakteriologie**, v. 16, p. 509-514, 1953.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Molecular insights into the history of plague. **Microb and Infect**, France, v. 4, p. 105–109, 2002.

EISEN, R.J.; GAGE, K.L. Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. **Vet Res**, v. 40, p.1, 2009.

ENGVAL, E., PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin. **G. Immunochemistry**. 8: 871-879, 1971.

- ERLICH, H. A. et al. Recent advances in the polymerase chain reaction, **Science**, Washington, v. 252, p. 1643-1651, 1991.
- FALCÃO, J. P; SOUZA, R. A . Gênero *Yersinia*. In: TRABULSI-ALTERTHUM. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 44, 2015. 361-374 p.
- FERREIRA, R.B.P. et al. Teste de Elisa indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. **Pesq. Vet. Bras.** 33: 528-534, 2013.
- GAGE, K. L.; KOSOY, M. Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Ann Rev Entomol**, v. 50, p. 505-528, 2005.
- GALIMAND et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 677-680, 1997.
- GIRARD, G.; ROBIC, J. Vaccination de l'homme contre la peste au moyen de germes vivants (virus vaccin EV). Premiers resultates acquis a Madagascar. **Bulletin Mensuel de l'Office International d'Hygiene Publique**, v. 28, p.1078, 1936.
- GOOKIN, J. L. et al. Single- tube nested PCR for detection of *Trichomonas faetus* in feline faces. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 4126-4130, 2002.
- GOUDSWAARD, J. et al. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. **Scand. J.Immunol.** 8: 21-28, 1978.
- HINNEBUSH B. J. et al. Role of *Yersinia murine* toxine in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, v. 296, p. 733-735, 2002.
- HINNEBUSCH, B.J. The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, p. 197-212, 2005.
- INGLESBY, T. V. et al. Plague as a biological weapon. **J Am Med Assoc**, Chicago, v. 283, p. 2281-2290, 2000.
- LEAL, N. C. et al. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 371-373, 1996.
- LEAL, T. C. et al. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. **Pesq Vet Bras**, Recife v. 17(1), p. 19-24, 1997.
- LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 41, p. 339-342, 1999.
- LEAL, N. C. et al. Homology among extra cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. **Braz J of Microbiol**, São Paulo, v. 31, p. 20-24, 2000.
- LIMA-BARROS, A.E. et al. Polysiloxane/PVA Glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by Elisa. **Braz J Med Biol Res.** 35: 459-463, 2002.

- LIMA, V.M.F. et al. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immune-assay using protein A in naturally infected dogs. **Pesq Vet Bras.** 25: 215-218, 2005.
- MELO, A. C.; ALMEIDA, A. M. P.; LEAL, N. C. Retrospective study of a plague outbreak by multiplex-PCR. **Lett Appl Microbiol**, Oxford. v. 37, n. 5, p. 361-364, 2003.
- MONTENEGRO, S.M.S; ALMEIDA, A.M.P; CARVALHO-JR, L.B. Standardization of the Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Dot-ELIZA) for experimental plague. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 88:119-123, 1993.
- MORALLET, H. H. Le cas de la peste. In: **Annales de démographie historique**. Paris, cap. 5, p. 101-110, 1989.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- NUNES, M. L. et al. The development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) procedure for plague diagnostic. **Am J Anal Chem**, v. 5, 1069-1077, 2014.
- PAULIE, S.; PERLMANN, H.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. **Encyclopaedia of Life Science**, Wiley. 2005.
- PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 10, p. 35-66, 1997.
- POLLITZER, R. History and present distribution of plague. In: **Plague. W.H.O. Monograph series-World Health Organization**, Geneva. v. 22, p. 11-45, 1954.
- PRENTICE, M.B.; RAHALISON, L. Plague. **Lancet**, v. 369, p. 1196-1207, 2007.
- RASMUSSEN, S. et al. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5.000 years ago. **Cell**, v. 163, p. 571-582, 2015.
- RASOAMANANA, B. et al. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. **Clin Diag Laborat Immunol**, 4: 587-591, 1997.
- RAOULT, D. et al. Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 12800-12803, 2000.
- RUSSELL et al. A comparison of plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. **Vaccine**, v. 13, p. 1551-1556, 1995.
- SAAVEDRA, R.C.; DIAS, J.P. Infecção por *Yersinia pestis*, no Estado da Bahia: controle efetivo ou silêncio epidemiológico? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44(2), p.223-227, 2011.

SCHNEIDER, M.C. et al. Where does human plague persist in Latin America? **PLOS Negl Trop Dis**. www.plosntds.org 1. v. 8. Issue 2. e2680, 2014.

SEBBANE F. et al. Role of *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 5526-5530, 2006.

SONG, Y. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA Research**, Tokyo, v. 11, p. 179-197, 2004.

SOUZA, G. T. et al. Development and evaluation of a single tube nested-PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. In: **Yersinia Meeting Proceeding Book**, 2007. 350-358 p.

STENSETH N, C. et al. Plague: past, present and future. **PLoS Med**, 5:9-13, 2008.

TAVARES, C. et al. Plague in Brazil: from now and then. **Adv Exp Med Biol**, v. 954, p. 69-77, 2012.

VAN WEEMEN, B. K.; SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antibody-enzyme conjugates. **FEBS Letters**, 43, 215-218. 1974.

VOGLER, A.J, KEIM, P., WAGNER, D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. **Infect Genet Evol**, v. 37, p. 21-36, 2016.

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A. The enzyme linked immunosorbent assay. A guide with abstracts of microplate applications. **Nuffield laboratories of Comparative Medicine**. London, 128p, 1979.

WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Plague in the Americas. **Scientific Publication** v. 115, p. 44-68, 1965.

WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Plague manual**. Epidemiology, distribution, surveillance and control. 171p. 1999.

WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Health Regulations** , 2 ed, World Health Organization, Geneva, 2008.

WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Plague around the world, 2010–2015. **WER**, v. 91, p. 89-93, 2016.

YLITALO, N. et al. Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and type-specific oligonucleotide hybridization. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1822-1828, 1995.

ZUREK L. et al. Vector competence of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) for *Yersinia pseudotuberculosis*. **J Med Entomol**, v. 38, p. 333-335, 2001.

6. METODOLOGIA E RESULTADOS

Apresentados sob a forma de artigos:

ARTIGO 1: Rodents and other small mammal reservoirs in plague foci in northeastern Brazil.

Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

Publicado em **The Journal of infection in Developing Countries.**

ARTIGO 2: Emprego do Teste ELISA Proteína-A para Diagnóstico Sorológico da Peste Bubônica.

Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Marília Barbosa do Nascimento, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

A ser submetido ao **Journal of Tropical Diseases & Public Health**

ARTIGO 3: Ensaio Imunoenzimático ELISA Proteína-A para a Vigilância da Peste em Cães Domésticos

Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

A ser submetido ao **Journal of Veterinary Science & Technology**

ARTIGO 1

ARTIGO PUBLICADO**RODENTS AND OTHER SMALL MAMMAL RESERVOIRS IN PLAGUE FOCI IN
NORTHEASTERN BRAZIL**

Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

JIDC | THE JOURNAL OF INFECTION
IN DEVELOPING COUNTRIES

Brief Original Article

Rodents and other small mammal reservoirs in plague foci in northeastern Brazil

Erika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

Center of Research Aggeu Magalhães, Recife, Brazil

Abstract

Introduction: Plague is an acute, infectious zoonotic disease, primarily of wild rodents and their fleas, that affects humans and other mammals. In Brazil, several plague foci are located in the northeast region. Plague surveillance based on monitoring of rodents was discontinued in 2007, and the current information on rodent populations is unsatisfactory. Our purpose was to update the information on rodents and other small mammals in plague foci in northeastern Brazil.

Methodology: Nine surveys in the historically most important northeastern plague areas were conducted in 2013-2015.

Results: In this study, 393 animals (13 rodent and four marsupial species) were entrapped. The plague bacterium *Yersinia pestis* was not detected in tissue sample cultures from the 225 animals that were analyzed. Eighty sera samples were analyzed for anti-F1 antibodies by hemagglutination (HA) and protein A ELISA tests, and all were negative, except for one marsupial, *Monodelphis domestica*, which was HA positive.

Conclusions: Qualitative and quantitative differences in the animal populations were observed in the areas surveyed, and the antibody positive marsupial indicated that plague continues to circulate in the wild.

Key words: Plague; *Yersinia pestis*; antibodies; rodents; marsupials.

J Infect Dev Ctries 2017; 11(5):426-430. doi:10.3855/jidc.8271

(Received 19 February 2016 – Accepted 22 July 2016)

Copyright © 2017 da Costa *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Plague is an acute, infectious zoonotic disease, primarily of wild rodents and their fleas, that is caused by the bacterium *Yersinia pestis*, which can affect both humans and other mammals. More than 200 rodent species are hosts/reservoirs of the infection [1]. Plague has a global distribution, with natural foci in Africa, Asia, and North and South America. According to the World Health Organization, 1000-3000 cases of the disease occur in humans annually [2-3].

Brazil has several plague foci that are within various ecological complexes: Ibiapaba, Baturité, Araripe, Triunfo, Borborema, Diamantina, Planalto Oriental, and Espinhaço, which are in the states of Ceará (CE), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB), Alagoas (AL), Bahia (BA) and Minas Gerais (MG), respectively, constituting the so-called "Northeast Focus," and Serra dos Orgãos in the state of Rio de Janeiro (RJ) (Figure 1). These foci are dated to when plague was first introduced in 1899 by sea at the beginning of the third Pandemic [4].

For several decades, the methodology of the plague surveillance and control program in Brazil consisted of collecting rodents and fleas and testing for the plague

bacillus [5-6] and serological surveys to detect anti-plague antibodies in sentinel animals (*e.g.*, rodents and domestic carnivores: dogs and cats) [7-11]. Based on an analysis of the results, the detection of antibodies was at least tenfold more sensitive among dogs than that in cats and rodents.

Domestic or wild carnivores (*e.g.*, dogs, cats, foxes, and skunks, among others) that prey on rodents can acquire *Y. pestis* infection from the bites of infected fleas and by eating infected prey; therefore, the sampling of a few carnivores is estimated as equivalent to sampling hundreds of rodents [12].

Therefore, plague surveillance in Brazil was restricted to serological surveillance of domestic dogs, and beginning in 2007, the monitoring of rodents and fleas was discontinued. Whereas studies on rodent populations in plague areas date back almost two decades, the current state of knowledge has faded over the years and further studies are required. Additionally, important changes have occurred in the focal areas, and the effects of climate change and anthropogenic changes in recent decades remain to be properly evaluated [13]. Furthermore, marsupials have not been fully investigated, with these small carnivores

disregarded because they are not considered sufficiently abundant to play any role in plague epizootiology or epidemiology in Brazil [14].

The aim of this paper was to update the information on rodents and other small mammals from the plague areas in northeast Brazil to determine the potential plague hosts in the different foci and to learn whether changes have occurred in the composition of the rodent populations compared with previous collections.

Methodology

Fieldwork

Fieldwork was performed following standard guidelines [12,15]. Nine one-week expeditions were conducted during 2013-2015 in the historically more important plague areas in the states of PE, BA, and CE. Rodent live traps (Sherman and Tomahawk) were placed in corn, bean, cotton, cassava, and sugarcane fields and in grasslands and forests. Traps were set in late afternoon and recovered early in the morning on the following day. Trapped animals were handled under anesthesia for collection of ectoparasites, sexing, and identification to species or genus, followed by euthanasia, weighing and measuring. Samples of blood and tissues (spleen or liver) were collected for analyses; skin and carcasses were preserved for taxonomic studies and deposited in zoological collections. In this study, the updated nomenclature of rodents according to Bonvicino *et al* [16] was adopted.

Laboratory analyses of samples

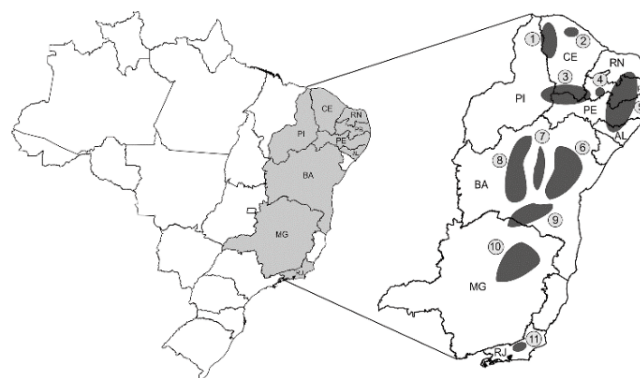
Serological analysis

A hemagglutination (HA) test [17] and a protein A (Protein A-Peroxidase *Staphylococcus aureus*/horseradish. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ELISA [17,18] were used to detect *Y. pestis* anti-F1 antibodies in sera samples from selected animals.

Bacteriological analysis

Tissue samples (spleen or liver) were preserved on Cary-Blair shipment and transport medium (Zhejiang Gongdong Medical Technology CO. LTD, Taizho, China) and from selected animals, were ground and plated directly on brain-heart infusion agar (BHI) medium (HiMedia Laboratories Pvt Ltd 23, Vadhani Industrial Estate, LBS Marg, Ghatkopar West, Mumbai, India) for identification and isolation of *Y. pestis*. Plates were incubated at 28°C for 48-72 h and inspected daily for the growth of characteristic colonies, which were further tested for lysis by anti-plague bacteriophage [17].

Figure 1. Plague foci in Brazil and location of study areas: 1. Serra da Ibiapaba; 2. Serra de Baturité; 3. Chapada do Araripe; 4. Serra Triunfo; 5. Planalto da Borborema; 6. Planalto Oriental da Bahia; 7. Piemonte da Diamantina; 8. Chapada Diamantina; 9. Planalto da Conquista; 10. Serra do Espinhaço; 11. Serra dos Órgãos.



Results

A total of 393 animals were entrapped during the nine surveys, which included 13 species of rodents, *i.e.*, *Necromys lasiurus* (*Zygodontomys lasiurus pixuna*, *Bolomys lasiurus*), *Calomys expulsus* (*Calomys callosus*), *Cerradomys langguthi* (*Oryzomys subflavus*), *Pseudoryzomys* spp., *Euryoryzomys* spp., *Oecomys* spp., *Oligoryzomys stramineus* (*Oryzomys elurus*, *Oligoryzomys elurus*), *Holochilus sciureus*, *Oxymycterus* spp., *Wiedomys pyrrhorhinos*, *Rattus rattus*, *Thrichomys laurentius* (*Cercomys cunicularis inermis*, *Thrichomys apereoides*), and *Galea spixii*, and four marsupials, *i.e.*, *Monodelphis domestica*, *Gracilinanus* spp., *Didelphis albiventris*, and *Marmosa* spp. (Table 1).

All 80 sera samples were negative for anti-F1 antibodies by hemagglutination (HA) and protein A ELISA tests (Table 2), with the exception of the serum from one marsupial, *M. domestica*, which was HA positive, although with low titer (1/16).

The plague bacillus was not found in any culture of the 225 animal tissue samples analyzed (Table 2). All cultures were multi-contaminated.

Discussion

Although plague remains active in numerous natural foci occupying large areas of different countries, the disease is largely neglected. Furthermore, surveys of plague reservoirs are scarce. Although Brazil has investigated plague more than any other South American country [19], the most extensive and complete research was developed until the 1980s [13].

Table 1. Distribution of the trapped animals by geographical origin.

Animals		Geographical origin (State and focus)							Total	%
		CE = 143		PE = 60			BA = 189			
		Baturité	Ibiapaba	Borborema	Triunfo	Araripe	Piemonte	Diamantina		
Rodents	<i>Necomys lasiurus</i>	13	34	5	15	1	9	18	95	24.2
	<i>Calomys expulsus</i>	0	0	0	0	0	42	8	50	12.8
	<i>Cerradomys langutthi</i>	7	16	5	5	1	26	21	81	20.6
	<i>Pseudoryzomys spp</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0.3
	<i>Euryoryzomys spp</i>	0	9	0	0	0	0	0	9	2.3
	<i>Oecomys spp</i>	0	2	0	0	0	0	0	2	0.5
	<i>Oligoryzomys stramieus</i>	0	0	0	1	0	33	5	39	9.9
	<i>Holochillus sciureus</i>	0	3	0	1	0	0	0	4	1.0
	<i>Oxymicterus spp</i>	0	10	0	0	0	0	0	10	2.6
	<i>Wiedomys pirhorrohinus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0.3
	<i>Rattus rattus</i>	5	2	0	0	1	1	13	22	5.6
	<i>Thrichomys laurentius</i>	0	7	0	3	14	0	6	30	7.7
	<i>Galea spixii</i>	0	0	0	0	6	0	0	6	1.5
	Without information	0	1	0	0	0	1	0	2	0.5
	Marsupials	<i>Monodelphis domestica</i>	4	11	2	1	0	0	4	22
<i>Gracilinanus spp</i>		0	15	0	0	0	0	0	15	3.8
<i>Didelphis albiventris</i>		0	1	0	0	0	0	1	2	0.5
<i>Marmosa</i>		0	2	0	0	0	0	0	2	0.5
Total		30	113	12	26	23	112	77	393	100
	%	7.6	28.8	3.0	6.6	5.9	28.5	19.6	100	

Table 2. Bacteriological culturing and hemagglutination (HA) and protein A ELISA tests for analyzed animals.

Species	Bacteriological analyses					Serological analyses				
	Distribution by State			Total	%	Distribution by State			Total	%
	CE	PE	BA			CE	PE	BA		
<i>Necromys lasiurus</i>	27	06	09	42	19	0	0	6	6	7.5
<i>Calomys expulsus</i>	0	0	40	40	18	0	0	15	15	18.7
<i>Cerradomys languthi</i>	21	05	26	52	23	0	0	25	25	31.3
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	0	0	31	31	14	0	0	7	7	8.7
<i>Holochilus sciureus</i>	01	0	0	01	0.5	0	0	0	0	0
<i>Oxymycterus spp</i>	10	0	0	10	4	0	0	0	0	0
<i>Rattus rattus</i>	01	01	01	03	1	4	1	12	17	21.3
<i>Thrichomys laurentius</i>	0	09	0	09	4	0	0	0	0	0
<i>Galea spixii</i>	0	06	0	06	3	0	5	0	5	6.3
<i>Monodelphis domestica</i>	12	02	0	14	6	1	0	3*	4	5
<i>Gracilinanus spp</i>	15	0	0	15	7	0	0	0	0	0
<i>Didelphis albiventris</i>	01	0	0	01	0	0	0	0	0	0
<i>Marmosa spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1.2
Without information	01	0	0	01	0.5	0	0	0	0	0
Total	89	29	107	225	100	6	6	68	80	100
%	39.5	13.0	47.5	100	-	7.5	7.5	85.0	100	-

*01 Positive HA – negative protein A ELISA tests.

This study demonstrated that the mammal species formerly involved in the epizootiological cycle of plague in Brazil remained in the historically most important plague areas. In these areas, thirteen rodent and four marsupial species were recorded, with most of these species previously reported in the plague areas of northeast Brazil [5, 9-10,14,20]. The taxonomy of small mammal species is under constant revision, and therefore, some rodents were assigned to other genera or species, and in the literature, some species are referred to with different names.

Based on bacteriological or serological testing, the following species of rodent are naturally infected: *R. rattus*, *Z. lasiurus pixuna* (*N. lasiurus*), *G. spixii*, *O. subflavus* (*C. langguthi*), *O. eliurus* (*O. stramineus*), *C. callosus* (*C. expulsus*), *Akodon arviculoides*, *C. cunicularius* (*T. apereoides*), *Nectomys squamipes*, and *Oxymycterus quaestor*. The naturally infected marsupials are *M. domestica* and *D. albiventris* [5,8-10,21].

The role of most of these species in the epidemiology of plague remains unknown. Karimi *et al* [21] determined the susceptibility to *Y. pestis* of the most common species from the plague focus of Chapada do Araripe (PE). Moreover, these authors detected differences in the susceptibility among specimens of the identical species with different geographical origins [21].

The species *C. langguthi* was previously identified as *O. subflavus*. The genus *Oryzomys* includes numerous species, and the *subflavus* species is recognized as a complex group that contains many species and genera. *Cerradomys* was coined to accommodate the *O. subflavus* group [22].

Specimens of *Pseudoryzomys* spp., *Euryoryzomys* spp., and *Oecomys* spp. were formerly misidentified as *O. subflavus* during the trapping conducted by previous plague workers. During this study, these specimens were distinguished from *C. langguthi*. Therefore, among the specimens referred to as *O. subflavus* [5,10,14], some individuals might be from any one of three genera.

The roles of marsupials, wild carnivores, and other predators of rodents (i.e., *M. domestica*, *D. albiventris*, *Marmosa* spp., and *Gracilinanus* spp.) in plague epidemiology in the Brazilian foci are not known and are perhaps underestimated. However, natural plague infection was detected by isolation of *Y. pestis* from *M. domestica* and its flea parasites and serologically in *M. domestica* and *D. albiventris* [5, 8-9, 14]. Experimentally, antibodies persisted for at least 3 years in ferrets (black-footed ferrets, carnivores) after

receiving vaccinations containing the *Y. pestis* F1 and V antigens [23]. The alleged scarcity of the marsupials could be due to the fact that the former trappings did not target their habitats [14]. In this study, trapping in the forests provided more specimens, including the only HA positive animal.

Although immune enzymatic assays are more sensitive than HA analysis, all of the sera samples analyzed by the Protein A ELISA were negative. Protein A has universal affinity for immunoglobulins (IgG) from almost all species of domestic and wild mammals and for IgA and IgM in some species [18]. Thus, the protein A conjugate can detect infection early, when infection would not be detectable by methods based on the use of anti-IgG conjugates. In the present study, all bacteriological analyses were negative, with all cultures multi-contaminated, which might have masked the growth of *Y. pestis*.

Necromys lasiurus, incriminated for plague amplification in nature [24], was more abundant in Serra da Ibiapaba and *C. expulsus*, *O. stramineus*, and *C. langguthi* were more abundant in Piemonte da Diamantina (BA). In addition to differences in susceptibility among specimens of the identical species but from different geographic origins, this difference in the composition of the rodent communities raises questions about the role of the identical species at different sites. To improve the understanding of the role of different rodent and other small mammal species in the epidemiology of plague in Brazilian foci areas, further studies are required.

Plague has declined in Brazil since the 1990s. However, plague is a cyclical disease in time and space; it can remain dormant for decades and then reappear suddenly, and the factors involved in the emergence or re-emergence are not fully understood [25]. Therefore, at any moment, unknown environmental, social, or other changes may trigger reemergence of plague in the Brazilian foci.

Conclusions

The results of the sampling conducted during this work revealed qualitative and quantitative differences in the rodent populations from the six areas that were studied, with higher abundance in Serra da Ibiapaba (CE) and Piemonte da Diamantina (BA); thus, these areas are more vulnerable to rodent-transmitted diseases. The antibody positive marsupial indicated that plague continues to circulate in the wild.

Acknowledgements

We acknowledge the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Process IBPG-0818-2.12/11), the National Reference Service for Plague from the CPqAM/FIOCRUZ-PE, and SVS/MS TC210/2011 (Process no. 24382.000448/2012-59). We are indebted to Silvana Santos and Fabiana L. de Almeida for technical assistance and to Gilvan Mariano from the Informatics Service from CPqAM/FIOCRUZ-PE for the construction of the figure 1.

References

- Butler T (2013) Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. *Am J Trop Med Hyg* 89: 788-793.
- Schneider MC, Najera P, Aldighieri S, Galan DI, Bertherat E, Ruiz A, Dumit E, Gabastou JM, Espinal MA (2014) Where does human plague persist in Latin America? *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2680.
- Weekly epidemiological record (2016) Plague around the world, 2010-2015. *WER* 91: 89-104.
- Giles J, Peterson AT, Almeida A (2011) Ecology and geography of plague transmission areas in Northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e925.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR (1985) Detection of *Yersinia pestis* in rodents and other small mammals in the northeast of Brazil during the period from 1966 to 1982. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 27: 207-218 [Article in Portuguese].
- Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR, Almeida AMP (1989) Research of the natural infection by *Yersinia pestis*, in fleas from plague foci of northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 177-181 [Article in Portuguese].
- Almeida CR, Almeida AMP, Vieira JBF, Guida U, Butler T (1981) Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. *Bull Wld Hlth Org* 59: 591-597.
- Almeida AMP, Leal NC, Carvalho FG, Sobrinho JD, Almeida CR (1995) Plague surveillance in Brazil: 1983 - 1992. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 511-516.
- Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, Rego RVB, Almeida CR (1989) Bacteriological and serological studies of a plague outbreak in the State of Paraíba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 249-256 [Article in Portuguese].
- Aragão AI, Seoane AC, Leal NC, Almeida AMP (2002) Surveillance of plague in the State of Ceará: 1990-1999. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 143-148 [Article in Portuguese].
- Aragão AI, Pontes RJS, Seoane ACM, Nascimento OJ, Tavares C, Almeida AMP (2007) Secular plague trend in Ceará State, Brazil. *Cad Saúde Publ* 23: 715-724 [Article in Portuguese].
- Dennis DT, Gage KL, Gratz N, Poland JD, Tikhomirov E (1999) Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control. Geneva: World Health Organization. Available: www.who.int/csr/resources/publications/plague/WHO.../en Accessed: 22 January 2017.
- Tavares C, Aragão AI, Leal NC, Leal-Balbino TC, de Oliveira MB, de Oliveira GFM, Almeida AMP (2012) Plague in Brazil: from now and then. In: Almeida AMP, Leal NC, editors. *Advances in Yersinia Research*. New York: Springer Science+Business Media. 69-77.
- Karimi Y, Almeida CR, Petter F (1976) Note on rodents in northeastern Brazil. *Mammalia* 40: 257-266 [Article in French].
- Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ (1995) Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus. *J Mamm* 76: 716-722.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, Cordeiro-Estrela P, D'Andrea PS, Almeida AM (2015) A taxonomic update of small mammal plague reservoirs in South America. *Vec B Zoon Dis* 15: 571-579.
- CHU M (2000) Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests: World Health Organization.
- Kelly PJ, Tagwira M, Matthewman L, Mason PR, Wright EP (1993). Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 16: 299-305.
- Faccini-Martínez AA, Sotomayor HA (2013) Historical review of the plague in South America: a little-known disease in Colombia. *Biomédica* 33: 8-27 [Article in Spanish].
- Saavedra RC, Dias JP (2011) *Yersinia pestis* infection in the State of Bahia: effective control or epidemiological silence? *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 223-227 [Article in Portuguese].
- Karimi Y, Almeida CR, Almeida AMP (1974) Experimental plague in Brazilian rodents. Epidemiological deductions. *Bull Soc Pathol Exot* 67: 591-601 [Article in French].
- Weksler M, Percequillo AR, Voss RS (2006) Ten new genera of Oryzomyine rodents (*Cricetidae: Sigmodontinae*). *Am Mus Novit* 3537: 1-29.
- Rocke TE, Smith S, Marinari P, Kreeger J, Enama J, Powell BS (2008) Vaccination with F1-V fusion protein protects black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) against plague upon oral challenge with *Yersinia pestis*. *J Wldl Dis* 44: 1-7.
- Baltazard M (2004) Research on plague in Brazil. *Bull Soc Pathol Exot* T97: 93-117 [Article in French].
- Gage KL (2010) Factors affecting the spread and maintenance of plague. In: Almeida AMP, Leal NC, editors. *Advances in Yersinia Research*. New York: Springer Science+Business Media. 79-94.

Corresponding author

Dr. Alzira Almeida. PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE
Campus da UFPE, Cidade Universitária
50740-465, Recife, PE, Brasil
Phone: 55-81-21012676
Fax: 55-81-21012647
Email: aalmeida@cpqam.fiocruz.br

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.

ARTIGO 2

**Emprego do ensaio imunoenzimático Proteína-A para diagnóstico sorológico da peste
bubônica**

*Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Marília Barbosa do Nascimento, Nilma Cintra
Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida.*

A ser submetido ao **Journal of Tropical Diseases & Public Health**

ISSN: 2329-891 XJTD

Emprego do ensaio imunoenzimático ELISA Proteína-A para Diagnóstico Sorológico da Peste Bubônica

Érika de Cássia Vieira da Costa¹, Marise Sobreira¹, Marília Barbosa do Nascimento¹ Nilma Cintra Leal¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹

1 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil

Autor para correspondência:

Dra. Alzira Almeida

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE

Campus da UFPE, Cidade Universitária

50740-465, Recife, PE, Brasil

Tel: 55-81-21012676

Fax: 55-81-21012647

Email: aalmeida@cpqam.fiocruz.br

Resumo

Introdução: A peste é primordialmente uma doença infecciosa de transmissão vetorial causada pela bactéria gram-negativa *Yersinia pestis*. O monitoramento das áreas focais exige a disponibilidade de métodos de diagnóstico rápidos, simples e eficientes utilizando técnicas sensíveis e específicas. Conjugados formados pela Proteína A do *Staphylococcus aureus* ligada a enzimas representam uma alternativa no desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da peste já que essa proteína possui afinidade universal com imunoglobulinas de diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens. Nosso objetivo foi avaliar uma técnica imunoenzimática (ELISA proteína-A) utilizando o conjugado “ProteinA-Peroxidase *Staphylococcus aureus*/horseradish” para o diagnóstico sorológico da peste.

Métodos: Análises de soros de coelhos e humanos pelas técnicas de hemaglutinação (HA) com hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno F1 da *Y. pestis*, ELISA IgG e ELISA proteína-A.

Resultados: O teste ELISA proteína-A padronizado para o diagnóstico da peste revelou-se sensível e específico nos testes com soros de coelhos: 19 soros de animais imunizados experimentalmente com culturas e com o antígeno F1 da *Y. pestis* foram positivos. 15 amostras de soros de coelhos não imunes e de quatro imunizados com outras espécies de yersínia foram negativas. Dentre 69 amostras de soros de pacientes analisadas, 17 originadas de surtos epidêmicos tinham títulos de HA 1/16-1/128, mas apenas seis foram positivas no ELISA proteína-A; 30 amostras HA negativas do mesmo período foram negativas e 22 amostras de soros de casos esporádicos recentes (2013-2015) de 15 pacientes (sete tinham amostras pareadas coletadas com algumas semanas de intervalo) foram negativas. Soros com baixos títulos ou reação HA inespecífica não foram reconhecidos no ELISA proteína-A.

Conclusão. O teste ELISA proteína-A oferece maior especificidade permitindo descartar as amostras com reações inespecíficas ou falso positivas desde a triagem o que repercute em grande ganho de tempo além de evitar desperdício de material.

Palavras-chave: Peste, *Yersinia pestis*, Diagnóstico, Hemaglutinação, ELISA, Proteína-A.

Introdução

A peste é uma doença infecciosa aguda, primariamente de roedores, causada pela bactéria *Yersinia pestis*, transmitida principalmente por meio de picada de pulgas infectadas que pode afetar o homem e outros mamíferos [1]. A peste ainda constitui um problema mundial de saúde pública e continua a merecer a atenção das autoridades sanitárias. Sucessivas epidemias atestam a contínua presença da peste mundialmente, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença reemergente sem tendência a desaparecer [2,3]. A peste está sujeita ao Regulamento Sanitário Internacional (RSI) [4] e no Brasil, consta na Lista de Notificação Compulsória (LNC), entre as doenças, agravos e eventos de importância para a saúde pública de abrangência nacional em toda a rede de saúde, pública e privada [5]. Sendo doença de notificação compulsória (DNC) é obrigação dos serviços de saúde a comunicação imediata de casos suspeitos. Todo caso de peste deve ser investigado em até 48 horas após a notificação, avaliando a necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes [5]. Segundo o procedimento padronizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) todos os casos notificados de peste são investigados e os dados são registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A Assistência Básica responde pelo atendimento dos pacientes e coletam-se duas

amostras de sangue para exames sorológicos (a primeira na fase aguda e a segunda após duas a três semanas); as amostras são remetidas ao laboratório para diagnóstico acompanhadas pela Ficha de Investigação de Caso Humano de Peste do Sistema de Informação Nacional de Peste (SISPESTE). O diagnóstico da peste é realizado, nos laboratórios credenciados pela SVS/MS os Laboratórios Centrais Estaduais (LACEN) dos estados com áreas focais, e no Serviço de Referência Nacional para a Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da FIOCRUZ (CPqAM/FIOCRUZ-PE). A prova de Hemaglutinação (HA) com hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno F1 da *Y. pestis* vem sendo usada há várias décadas no diagnóstico e vigilância da peste humana, no rastreamento da peste entre os animais e em inquéritos sorológicos para delimitação dos focos [6-11]. Essa técnica pode apresentar falsas interpretações, exigindo por essa razão, pessoal altamente qualificado. Além disso, sua execução é complexa e laboriosa e requer produtos perecíveis como sangue de carneiro e hemácias sensibilizadas (GV), além de consumir grande quantidade do antígeno F1 e soro normal de coelhos (SNC) na preparação dos diluentes [12]. Testes imunoenzimáticos para detecção de IgM ou IgG, e para captura de antígeno (F1) são úteis para o diagnóstico da peste, mas requerem o uso de anticorpos espécie-específico para soros humanos, roedores, cães e gatos [12]. Conjugados à base de Proteína A do *Staphylococcus aureus* (ProteinA) ligada a enzimas representam uma alternativa no desenvolvimento de testes sorológicos. A proteína A tem afinidade universal para imunoglobulinas (IgG) de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens além da IgA e IgM em algumas espécies [13-15]. Um ensaio imunoenzimático utilizando um conjugado com a Proteína A tem potencial para ser aplicado em soros originados de humanos, mamíferos domésticos e selvagens e apresenta importantes vantagens sobre a HA pela simplicidade e rapidez de execução e facilidade de interpretação além de maior sensibilidade e especificidade [16-19]. Diante da importância do monitoramento constante das áreas focais da peste [3-20]. Faz-se necessário o emprego de métodos de diagnóstico rápidos, simples e eficientes utilizando técnicas sensíveis e específicas. Nosso objetivo foi avaliar a técnica imunoenzimática (ELISA proteína-A) utilizando o conjugado *ProteinA-Peroxidase Staphylococcus aureus/horseradish* para o diagnóstico laboratorial da peste.

Material e Métodos

Soros de coelhos

Os estudos envolveram 38 amostras de soros de coelho sendo 19 de animais imunizados: 13 com o antígeno F1 (anti-F1); e seis (anti-cepa total) com as cepas de *Y. pestis* P. Exu 11 (01), P. Exu 13 (01), P. Exu 16 (1), P. Exu 769 (1), P. CE 882 (01) e A1122 (1); cepas de *Y. pseudotuberculosis* (02) e de *Y. enterocolitica* (02) e soro normal de coelhos (SNC = 15). Os soros anti-F1 foram produzidos por inoculação intramuscular (IM) do antígeno F1 em adjuvante incompleto de Freund [12]. Os soros anti-cepa total foram produzidos por inoculação intravenosa (IV) de suspensões de culturas das cepas inativadas pelo formol (*formol killed*) [21]. Os soros anti *Y. pseudotuberculosis* e de *Y. enterocolitica* foram gentilmente cedidos pelo CDC (Center for Disease Control, Fort Collins, Co, USA). Os SNC foram obtidos de coelhos do Biotério de Criação de Animais do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

Soros humanos

Foram utilizadas 69 amostras de soro de pacientes atendidos por demanda espontânea pela Assistência Básica nas áreas focais de peste [5,7,9]. Como controle negativo foram utilizadas duas amostras de soro de indivíduos de área não endêmica cedidas gentilmente para o trabalho.

Imunobiológicos e reagentes

O antígeno F1 (Fração 1), uma proteína capsular específica da *Y. pestis* foi extraído de uma cepa de referência (*Y. pestis* A1122) segundo protocolo baseado em Baker et al (1952) e Chu (2000)[12]. Os seguintes conjugados foram testados em diversas diluições para determinar a melhor concentração: Peroxidase-Labeled Affinity purified Antibody to rabbit IgG (H+L) 04-15-06 (KPL, Gaithersburg, MD-USA) diluído a 1/1000 e 1/2000; Protein A-Peroxidase *Staphylococcus aureus*/horseradish (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) diluído a 1/6000 e 1/10000. Como substrato para revelação da reação foi usado o cromógeno ABTS: 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS Peroxidase Substrate System (2 component), 50-62-

00/50-62-01, KPL, Gaithersburg, MD-USA) e para interromper a reação foi usada a solução stop NaF 1,25% (Sodium Fluorid, Sigma Ultra 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Provas sorológicas

Hemaglutinação (HA)

A prova da hemaglutinação passiva (HA) com hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno F1 da *Y. pestis* consiste na determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos específicos contra o antígeno F1 [12]. Em resumo, os soros são inativados em banho-maria a 56°C e adsorvidos com hemácias de carneiro fixadas em Solução de Alséver. Os soros são diluídos seriadamente (1/4 a 1/32 ou até 1/8.192) em salina contendo soro normal de coelho (1/250) em placas de microtitulação de 96 poços em “U” e em seguida é colocada uma suspensão de hemácias de carneiro (GV) fixadas em glutaraldeído, taninizadas e sensibilizadas com a F1 (GV/F1). Paralelamente, faz-se a prova de inibição da hemaglutinação (HI) para verificar a especificidade da reação. Na HI os soros são diluídos em salina contendo soro normal de coelho (1/250) e 100 µg/ml de F1. O título da reação é calculado pelo número de poços com aglutinação específica que é a diferença entre o número de poços com aglutinação (HA) e o número de poços com inibição (HI). Os soros com títulos de aglutinação específica igual ou maior que 1:16 são considerados positivos [12].

Ensaio imunoenzimático IgG em coelhos

Para padronização da reação foram realizados ensaios utilizando um soro de coelho hiperimune anti-F1 (Coelho 04, título HA: 1/4.096) e um soro normal de coelho (SNC 01), o conjugado anti-IgG de coelho e o branco contendo todos os reagentes sem o anticorpo primário. Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita previamente por diversos autores [16-17,19,23-24]: as placas foram sensibilizadas pela adição das diluições do F1 e incubadas por 1 hora em câmara úmida a 37°C para fixação do antígeno, seguido pela lavagem (3x) com tampão de lavagem para a eliminação do antígeno não fixado. O bloqueio dos sítios livres foi realizado pela adição de 200 µL/poço da solução de bloqueio mantendo por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) em agitação ou em câmara úmida a 37° C seguido de lavagem (3x) e adição dos soros (100 µL/poço) em triplicata, incubação à 37°C por 1 hora, lavagem 3x; adição de 100 µL/poço do

conjugado rabbit-IgG, incubação por 1 hora à 37°C; lavagem 3x e adição de 100 µL/ poço do substrato de revelação, mantido em TA protegido da luz por 30 minutos a 1 hora. A reação foi bloqueada pela adição da solução stop (50 µL/poço), as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro com filtro de 405 nm. Os resultados foram calculados pela média da densidade óptica (DO) obtida de cada soro (positivo e negativo) em triplicata subtraindo a DO do branco. As diluições ótimas de antígeno, soro e conjugado foram estabelecidas pela maior razão entre a média de DO das amostras positivas e a média de DO das amostras negativas, menos o branco [25]. A concentração ótima do antígeno foi determinada considerando a mais baixa concentração que permitiu positividade da reação com a menor diluição do soro positivo de coelho. A diluição ótima do soro positivo de coelho e dos conjugados foi a que permitiu maior diferença na leitura entre o positivo e negativo na menor concentração do antígeno. O *cut off* foi definido pela média das DO do soro negativo mais três vezes o desvio padrão [25].

Ensaio imunoenzimático proteína-A em soros de coelhos e humanos

As amostras de soros de coelhos (38) e humanas (69) foram analisadas pela técnica ELISA proteína-A nas mesmas condições estabelecidas para o ELISA IgG utilizando como conjugado a proteína-A.

Resultados e Discussão

Padronizaçãodo ensaio utilizando soros de coelhos

As condições ótimas determinadas para o ELISA IgG e ELISA proteína-A com as amostras de soro dos coelhos foram: concentração de antígeno de 500 ng/poço, diluição dos soros 1:500, conjugado anti-IgG 1:2.000 e conjugado proteína-A 1:10.000. O *cut off* estabelecido para IgG de coelhos foi de 0,397 nos testes com 19 amostras de soro normal de coelho, não reagentes pela hemaglutinação (HA negativas). Nas condições adotadas, obteve-se uma razão de 21,00 entre as DO dos controles positivo e negativo de coelho nos ensaios com ELISA IgG e de 348,8 no ELISA proteína-A. As médias das DO das amostras de soro de coelho negativas foram mais baixas do que as médias das DO das amostras positivas, tanto no ELISA IgG (0,146 e 3,067) como no ELISA proteína-A (0,010 e 3,488).

Análises das amostras de soro de coelho

Das 19 amostras de soro de coelhos anti-F1 (13) e seis anti-cepa total (com diferentes cepas) com títulos de HA 1/4 a 1/128 testadas, foram positivas no ELISA proteína-A na diluição de 1/500. As 15 amostras de SNC foram negativas. As duas amostras de soros anti-*Y. pseudotuberculosis* e anti-*Y. enterocolitica* negativas por HA foram negativas no ELISA proteína-A e todos os soros normais de coelho (SNC) negativos por HA também foram negativos no ELISA proteína-A.

Ensaio imunoenzimático proteína-A em soros humanos

O *cut off* calculado para ELISA proteína-A em humanos foi de 0,255, utilizando 30 amostras de soros humanos HA negativos. As 30 amostras escolhidas aleatoriamente entre as HA negativas incluíam soros não reagentes e soros reagentes inespecificamente. Estas podem apresentar alto título de hemaglutinação que não é inibido na reação de inibição da hemaglutinação (HI). Nas condições estabelecidas foram analisadas 17 amostras HA positivas com títulos de 1/16 a 1/128. Destas, oito foram obtidas durante o surto de peste na Paraíba em 1986 [7] seis das quais foram positivas no ELISA proteína-A e nove amostras de área hiperendêmica do Ceará em 1979 [9-26] com títulos de HA de 1/32 a 1/64, resultando todas negativas para ELISA proteína-A. Adicionalmente foram analisadas 30 amostras HA negativas de pacientes dos focos pestosos do Ceará (15), Paraíba (12), Bahia (01), Minas Gerais (01) e Rio de Janeiro (01) obtidas de casos esporádicos no período 1983 a 1986 e todas foram negativas no ELISA proteína-A. A incidência da peste vem declinando no Brasil e o último caso confirmado laboratorialmente foi registrado em 2005, no estado do Ceará [26]. Entretanto, casos clinicamente suspeitos de peste sem confirmação laboratorial são continuamente registrados nas áreas históricas da doença no Ceará. Clinicamente esses casos se enquadram no conceito de "pestis minor" ou peste benigna. Evidências antigas e atuais em diversos países de pacientes apresentando bubões e febre baixa, recuperando-se sem antibióterapia suportam a existência dessa forma clínica da peste que ainda não está definitivamente comprovada [1,5]. A maioria desses pacientes apresenta alto título de HA que não é inibida na HI (aglutinação inespecífica). 22 amostras de soros de 15 pacientes (sete pacientes tiveram amostras pareadas coletadas com algumas semanas de intervalo) foram analisadas pelo ELISA proteína-A e todas foram negativas. O conjugado proteína-A pode detectar anticorpos sorológicos na fase inicial da infecção, que não seriam detectáveis em métodos baseados no uso de conjugados anti-IgG, uma

vez que a proteína A além de reagir com subclasses das IgG ligando-se à cadeia pesada do anticorpo também reconhece anticorpos das classes IgM e IgA [13-15]. Entretanto, não foi observada soroconversão nas amostras pareadas dos sete pacientes obtidas na fase inicial da doença e na convalescença. Na hemaglutinação, faz-se inicialmente uma triagem dos soros nas diluições de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{32}$. Os soros reagentes nas diluições $\geq \frac{1}{16}$ são reanalisados em diluições mais altas, $\geq \frac{1}{128}$ em paralelo à prova de HI. Em geral esta etapa necessita ser repetida 2 a 3 vezes para que se obtenha um resultado final [12]. Semelhante ao HA o teste ELISA proteína-A poderá ser utilizado em soros de humanos e diferentes animais (roedores, carnívoros domésticos e selvagens) utilizando o mesmo protocolo e o mesmo conjugado. Entretanto, a medida que a zoonose vem declinando nos focos brasileiros surge o problema da falta de controles positivos confiáveis principalmente para os testes com soros humanos e de cães. A hemaglutinação emprega como controle negativo SNC de coelhos e como controles positivos antissoros de coelhos imunizados no laboratório nas reações com soros de qualquer fonte. Similarmente, nos testes ELISA proteína-A deve-se também testar sempre SNC e soros imunes de coelhos inoculados experimentalmente no laboratório em paralelo aos soros de outras origens para assegurar de que a reação está funcionando adequadamente.

Conclusão

O teste ELISA proteína-A revelou-se específico não reconhecendo as amostras de SNC ou dos animais inoculados com outras espécies de *Yersinia* nem de pacientes com aglutinação inespecífica. Em relação à sensibilidade, reconheceu todos os soros de coelhos imunizados com F1 ou diferentes cepas de peste mesmo os de baixos títulos, mas com os soros humanos reconheceu apenas os soros com títulos mais altos de HA. Isto poderia ser atribuído à diluição dos soros humanos utilizada ($\frac{1}{500}$), devendo-se utilizar menor diluição. Também não pode ser descartada a hipótese de que os soros com baixo título de HA sejam falsos positivos, porque a maioria apresenta um certo nível de aglutinação inespecífica. Nesse caso o teste ELISA proteína-A oferece a vantagem de maior especificidade permitindo descartar as amostras com reações inespecíficas desde a triagem o que repercute em grande ganho de tempo além de evitar desperdício de material.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Processo IBPG-0818-2.12/11) e ao CNPq (Processo 305570/2011-0).

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

Contribuição dos autores

Todos os autores contribuíram significativamente para o trabalho: ECVC realizou os testes sorológicos e redigiu o manuscrito; MBN participou da padronização dos testes imunoenzimáticos; MS e NCL contribuíram para a análise dos dados e edição do manuscrito; AMPA contribuiu para a edição final do manuscrito.

Aspectos éticos

Os trabalhos com os coelhos foram realizados de acordo com as recomendações da CEUA/CPqAM. As análises das amostras de soro humano foram aprovadas pela CEP/CPqAM (CAAE: 50163615.8.0000.5190).

Referências

1. Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. Clin Microb Rev. 10:35-66.
2. Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M et al. (2008) Plague: past, present, and future. PLoS Med. 5: e3.
3. Schneider MC, Najera P, Aldighieri S, et al. (2014) Where does human plague persist in Latin America? PLoS Negl Trop Dis. 8:e2680.
4. WHO. International Health Regulations. 2 ed., World Health Organization, Geneva. 2008:74.
5. Tavares C, Aragão I, Leal NC, Leal-Balbino TCA, Oliveira MBM, Oliveira GM, Almeida AMP (2012) Plague in Brazil: from now and then. Adv Exp Med Biol. 954:69-77.
6. Almeida CR, Almeida AR, Vieira JB, Guida U, Butler T (1981) Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. Bull Wld Hlth Org. 59:591-597.
7. Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, Rego RVB, Almeida CR (1989) Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 84:249-256.
8. Almeida AMP, Leal NC, Carvalho FG, Dantas-Sobrinho J, Almeida CR (1995) Plague surveillance in Brazil: 1983-1992. Rev Inst Med Trop São Paulo. 37: 511-516.

9. Aragão AI, Seoane AC, Leal NC, Almeida AMP (2002) Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1990-1999. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35:143-148.
10. Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane ACM, Tavares C, Almeida AMP (2009) Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos do Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42:711-715.
11. Saavedra RC & Dias JP (2011) Infecção por *Yersinia pestis* na Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44:223-227.
12. Chu M (2000). *Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests.* CDC/WHO. Geneve, 129.
13. Goudswaard J, Vander Donk JA, Noordzij A, Van Dam RH, Vaerman JP (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand. J. Immunol.* 8:21-28.
14. Surolia A, Pain D, Khan MI (1982) Protein A: nature's universal anti-antibody. *T1BS.* 74-76.
15. Kelly PJ, Tagwira M, Matthewman L, Mason PR, Wright EP (1993) Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 16:299-305.
16. Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr G, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ (1996) A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 55:39-44.
17. Rasoamanana B, Leroy F, Boisier P, Rasolomaharo M, Buchy F, Carniel E, Chanteau S (1997) Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin Diag Laborat Immunol.* 4: 587-591.
18. Lima VMF, Biazonno L, Silva AC, Corrêa APFL, Luvizotto MCR (2005) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immune-assay using protein A in naturally infected dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 25:215-218.
19. Rajerison M, Darteville S, Ralafiarisoa LA, Bitam I, Tuyet DT, Andrianaivoarimanana V, Nato F, Rahalison L (2009) Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis.* 3: e421.
20. Almeida AMP, Souza GT, Santos S, Silva SC, Petribú MMV, Haver PO, Aragão AI, Tavares C (2007) Contribuição para o diagnóstico da peste. *Rev Soc Bras M Trop.* 40: 53-55.
21. Baltazard M, Davis DHS, Devignat R, et al. (1956) Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. *Bull Wrld Hlth Org.* 14:457-509.

22. Baker EEH, Sommer LE, Meyer E. & Meyer KF (1952) Studies on immunization against plague. Isolation and characterization of soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 68:131-145.
23. Almeida AMP, Ferreira LCS (1992) Evaluation of three serological tests for the detection of human plague in Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 87:87-92.
24. Ferreira RBP, Larangeira FD, Oliveira, SL, Malta CCM, Gomes CM, Bastos LB, Portela WR, Barrouin-Melo MS (2013) Teste de Elisa indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. Pesq. Vet. Bras. 33:528-534.
25. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski DA. A statistically defined endpoint 335 titer determination method for immunoassays. J. Immunol. Methods. 221: 35-41, 1998.
26. Aragão AI, Pontes RJS, Seoane ACM, Nascimento OJ, Tavares C, Almeida AMP (2007) Tendência Secular da peste no estado do Ceará, Brasil. Cadernos de Saúde Pública (ENSP. Impresso). 23: 715-724.

ARTIGO 3

Ensaio Imunoenzimático ELISA Proteína-A para a Vigilância da Peste em Cães Domésticos

Érika de Cássia Vieira da Costa, Marise Sobreira, Nilma Cintra Leal, Alzira Maria Paiva de Almeida

A ser submetido ao **Journal of Veterinary Science & Technology**

ISSN: 2157-7579 JVST

Ensaio Imunoenzimático ELISA Proteína-A para a Vigilância da Peste em Cães Domésticos

Érika de Cássia Vieira da Costa¹, Marise Sobreira¹, Nilma Cintra Leal¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹

¹ *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil*

Autor para correspondência:

Dra. Alzira Almeida

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE

Campus da UFPE, Cidade Universitária

50740-465, Recife, PE, Brasil

Tel: 55-81-21012676

Fax: 55-81-21012647

Email: aalmeida@cpqam.fiocruz.br

Resumo

A peste, zoonose primária de roedores, afeta mais de 200 espécies de mamíferos. Os cães, predadores dos roedores, se infectam através das pulgas/vetores ou pela ingestão de suas presas infectadas e foi estimado que a amostragem de alguns poucos desses animais equivale a amostragem de centenas de roedores. Os cães infectados pela *Yersinia pestis* desenvolvem um quadro clínico brando, se recuperam e desenvolvem anticorpos que permanecem por cerca de 300 dias. Na natureza o tempo de exposição dos cães ao antígeno não é conhecido podendo tratar-se de uma infecção recente com anticorpos IgM ou antiga com anticorpos IgG. A proteína A do *Staphylococcus aureus*, tem afinidade universal para imunoglobulinas de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens e para os cães tem afinidade para diversas classes de IgG além

da IgA e IgM. A técnica de hemaglutinação (HA) para detecção de anticorpos contra o antígeno F1 da *Y. pestis* rotineiramente empregada no diagnóstico da peste é uma técnica complexa e laboriosa, utiliza insumos perecíveis e exige pessoal altamente qualificado para sua execução. Com o objetivo de contribuir para o aperfeiçoamento do diagnóstico e vigilância da peste foram realizadas análises pelo teste ELISA proteína-A em 186 amostras de soros de cães obtidas no período de 1985-2015 nas áreas focais pelas equipes locais da vigilância da peste. De 27 amostras HA positivas com títulos 1/16 a 1/1.024, 37% foram positivas no ELISA proteína-A sendo a positividade proporcional aos títulos de HA. 159 amostras HA negativas ou apresentando altos níveis de aglutinação inespecífica foram também negativas pelo ELISA proteína-A. Além da facilidade de execução e de interpretação, devido à automação, o teste ELISA proteína-A permite uma definição dos soros (positivo/negativo) desde a triagem, proporcionando economia de tempo e de material.

Palavras-chave: Peste; *Yersinia pestis*; Diagnóstico; Hemaglutinação; ELISA; Proteína-A

Introdução

A peste é uma zoonose primariamente de roedores silvestres, de transmissão vetorial, mas já foi detectada em mais de 200 espécies de mamíferos em todo o mundo [1]. Casos humanos da doença são registrados anualmente em vários países na África, Ásia, incluindo a antiga União Soviética e nas Américas. A peste persiste em focos naturais em numerosos países, os avanços tecnológicos e os conhecimentos científicos acumulados até o presente ainda não foram suficientes para erradicá-la [2-5].

Atualmente a peste é considerada uma doença reemergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com tendência ao aumento do número de casos e de sua dispersão geográfica [3,5]. A peste possui a capacidade de causar um impacto significativo na saúde pública e de rápida disseminação podendo gerar uma emergência de saúde pública internacional que exige notificação a OMS segundo o Regulamento Sanitário Internacional vigente [6].

Introduzida no Brasil em 1899, a zoonose permanece em focos naturais em vários complexos ecológicos disseminados principalmente na região Nordeste [7].

O Brasil mantém um programa continuado de vigilância e controle da peste praticamente desde os primeiros momentos da chegada da doença no País [7-8]. Durante várias décadas, as atividades do programa de vigilância e controle da peste no Brasil consistiam na captura de roedores e coleta de pulgas para pesquisa da bactéria (*Yersinia pestis*) [9-10], e inquéritos sorológicos para detecção de anticorpos antipestosos entre roedores e carnívoros domésticos (cães e

gatos) [11-14]. Análise dos resultados das amostras testadas entre 1998 e 2005, revelou que a detecção de anticorpos era pelo menos dez vezes mais sensível entre os cães do que nos gatos e em roedores. Diante desse resultado a vigilância da peste passou a ser limitada a vigilância sorológica de cães domésticos (animais sentinela) [7].

A técnica de hemaglutinação (HA) empregada nas atividades de monitoramento da peste nos focos pestosos brasileiros permite a determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos contra o antígeno F1, uma proteína capsular específica da *Y. pestis*, através da utilização do mesmo protocolo de ensaio para diagnóstico da peste em humanos e nas diferentes espécies de animais [15-16]. Entretanto a HA é uma técnica complexa e laboriosa, utiliza insumos perecíveis e exige pessoal altamente qualificado para sua execução [15].

Diante da importância do monitoramento constante das áreas de foco da peste [4,7], faz-se necessário o emprego de métodos de diagnóstico rápidos, simples e eficientes utilizando técnicas sensíveis e específicas.

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) apresentam vantagens sobre a HA principalmente para as atividades de vigilância sorológica em grande escala [17-18]. Uma limitação aos testes imunoenzimáticos é a necessidade de conjugados específicos para as diversas espécies de imunoglobulinas [15].

Um ensaio imunoenzimático utilizando um conjugado com a Proteína A tem o potencial para ser aplicado em soros originados de humanos, mamíferos domésticos e selvagens e apresenta importantes vantagens sobre a técnica de HA pela simplicidade e rapidez de execução e facilidade de interpretação além de maior sensibilidade e especificidade [19-22].

A proteína A uma proteína do *Staphylococcus aureus*, tem afinidade universal para imunoglobulinas de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens; para os cães tem afinidade para diversas classes de IgG além da IgA e IgM [23-25]. Vários protocolos foram desenvolvidos utilizando conjugados à base de Proteína A ligada a enzimas para estudos em cães [19-22,26].

O objetivo desse estudo foi avaliar um ensaio imunoenzimático, ELISA proteína-A, para diagnóstico da peste nos cães visando otimizar a metodologia das atividades de vigilância e controle da peste no Brasil.

Material e métodos

Amostras sorológicas e reagentes

As amostras de soros de cães foram coletadas pelas equipes dos programas de vigilância e controle da peste nas áreas focais nos Estados da Paraíba (PB), Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Alagoas (AL), Pernambuco (PE) e Minas Gerais (MG) no período de 1985 a 2015 durante investigação de surtos ou nas atividades de rotina da vigilância. Todas as amostras foram analisadas pela técnica de hemaglutinação (HA) nas atividades de rotina do Serviço de Referência Nacional em Peste (SRP) e incluíram amostras positivas e negativas: não reagentes e com aglutinação inespecífica.

Foi construído um banco de dados em planilha Excel com a identificação das amostras na origem, identificação das amostras no laboratório, local de origem, data da coleta, resultados das análises pelos testes de HA-HI e título da reação (aglutinação específica), resultados dos testes ELISA-proteína A.

Como controle das reações foram usados soros hiperimunes de coelhos (anti-F1) e soro normal de coelho (SNC). Os soros imunes foram produzidos por inoculação intramuscular (IM) do antígeno F1 em adjuvante incompleto de Freund [15]. Os SNC foram obtidos de coelhos do Biotério de Criação de Animais do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

O antígeno F1 (Fração 1), uma proteína capsular da *Y. pestis*, foi extraído da cepa *Y. pestis* A1122 [15]. Os seguintes conjugados foram testados em diversas diluições para determinar a melhor concentração: Peroxidase-Labeled Affinity purified Antibody to rabbit IgG (H+L) 04-15-06 (KPL, Gaithersburg, MD-USA) diluído a 1/1000 e 1/2000; Protein A-Peroxidase *Staphylococcus aureus*/horseradish (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) diluído a 1/6000 e 1/10000. Como substrato para revelação da reação foi usado o cromógeno ABTS: 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS Peroxidase Substrate System (2 component), 50-62-00/50-62-01, KPL, Gaithersburg, MD-USA) e para interromper a reação foi usada a solução stop NaF 1,25% (Sodium Fluorid, Sigma Ultra 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Análises sorológicas

Hemaglutinação (HA)

Os soros teste foram inativados em banho-maria a 56°C e adsorvidos com hemácias de carneiro fixadas em Solução de Alséver. Os soros foram diluídos seriadamente (1/4 a 1/32 ou até 1/8.192) em salina contendo soro normal de coelho (1/250) em placas de microtitulação de 96 poços

em “U” e em seguida foi colocada uma suspensão de hemácias de carneiro fixadas em glutaraldeído, taninizadas e sensibilizadas com a F1 (GV/F1). Paralelamente, fez-se a prova de inibição da hemaglutinação (HI) para verificar a especificidade da reação. Na HI os soros foram diluídos em salina contendo soro normal de coelho (1/250) e 100 µg/ml de F1. O título da reação foi calculado pelo número de poços com aglutinação específica que é a diferença entre o número de poços com aglutinação (HA) e o número de poços com inibição (HI). Os soros com títulos de aglutinação específica igual ou maior que 1/16 são considerados positivos [15].

Padronização do ELISA

ELISA IgG em coelho

Foram realizados ensaios baseados em diversos protocolos para estabelecer as condições das reações [18,20-22,26] utilizando equipamento para ELISA Bio-Rad PW40, (Marnes-la-Coquette, 92430, France); espectrofotômetro Bio-Rad Benchmark Plus com filtro de 405 nm (Marnes-la-Coquette, 92430, France) e placas de microtitulação de poliestireno rígido de 96 poços, fundo plano (COSTAR 3590. New York, USA).

O antígeno F1 foi testado nas concentrações de 500 ng, 1 µg e 2 µg / poço utilizando um soro hiperimune de coelho (anti-F1, HA: 1/4.096) e um soro normal de coelho (SNC 01) diluídos a 1/100, 1/200, 1/500 e 1/1.000, o conjugado anti-IgG de coelho diluído a 1/1.000 e 1/2.000 e o branco contendo todos os reagentes sem o anticorpo primário. As amostras de soro foram testadas em triplicata.

Os resultados foram calculados pela média da densidade óptica (DO) obtida de cada soro positivo e negativo (em triplicata) subtraindo a DO do branco. As diluições ótimas de antígeno, soro e conjugado foram estabelecidas pela maior razão entre a média da DO da amostra positiva e a média da DO da amostra negativa, menos o branco.

A concentração ótima do antígeno foi determinada considerando a mais baixa concentração que permitiu positividade da reação com a menor diluição do soro positivo de coelho. A diluição ótima do soro positivo de coelho e dos conjugados foi a que permitiu maior diferença na leitura entre o positivo e negativo na menor concentração do antígeno. O *cut off* foi definido pela média das DO do soro negativo mais três vezes o desvio padrão.

ELISA proteína-A

Condições gerais das reações com os parâmetros estabelecidos

As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 100 µL/poço de F1 (500 ng/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$) 0,05M, pH 9,6 e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguido de três lavagens (3x) com Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 9.6 com 0.05% de Tween 20 (PBST) e bloqueio com 200 µL/poço de PBST com 5% de leite em pó desnatado, por 30 minutos com agitação, em temperatura ambiente (TA). Após três lavagens com PBST foram adicionados os soros teste no volume de 100 µL/poço em triplicata diluídos a 1/500 em PBST com 5% de leite. Após uma hora de incubação à 37°C, e três lavagens com PBST foi adicionado o conjugado Protein A (1/10000). As placas foram lavadas 3x e foi adicionado 100 µL/poço de solução do cromógeno ABST, mantido em ambiente escuro a 37°C em câmara úmida, por 30 minutos. Para finalizar foi adicionada a solução *stop* NaF 1,25%. A leitura das DO foi realizada no comprimento de onda de 405 nm utilizando espectrofotômetro Bio-Rad Benchmark Plus (Marnes-la-Coquette, 92430, France) em até 15 minutos.

Em todos os ensaios foram usados soros positivo (anti-F1) e negativo de coelhos como controle da reação e um branco contendo todos os componentes da reação sem o anticorpo primário para eliminação do background.

Resultados e discussão

No Brasil as áreas focais de peste são continuamente monitoradas através de inquéritos sorológicos em cães domésticos. O diagnóstico da peste nas amostras sorológicas é realizado, nos laboratórios credenciados pela SVS/MS, os Laboratórios Centrais Estaduais (LACEN) dos estados com áreas focais. Segundo norma da SVS/MS todas as amostras positivas e 10% das negativas analisadas nos LACEN são remetidas para confirmação no SRP [7]. Isto possibilita adicionalmente o SRP acompanhar a evolução das atividades da peste nos focos através das amostras recebidas para controle de qualidade.

A técnica de hemaglutinação com hemácias de carneiro sensibilizadas com o antígeno F1 da *Y. pestis* utilizada nas análises das amostras sorológicas pode apresentar falsas interpretações, exigindo por essa razão, pessoal altamente qualificado. Além disso, sua execução é complexa e laboriosa e requer produtos perecíveis como sangue de carneiro e hemácias sensibilizadas, além de consumir grande quantidade do antígeno F1 e soro normal de coelhos na preparação dos diluentes [15].

Testes imunoenzimáticos para detecção de IgM ou IgG, e para captura de antígeno (F1) são úteis para o diagnóstico da peste, mas requerem o uso de anticorpos espécie-específico para soros humanos, de roedores, cães e gatos [15].

Conjugados à base de Proteína A do *Staphylococcus aureus* (ProteinA) ligada a enzimas representam uma alternativa no desenvolvimento de testes sorológicos. A proteína A tem afinidade universal para imunoglobulinas (IgG) de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens além da IgA e IgM em algumas espécies [23-25].

No presente trabalho foram analisadas 186 amostras de soros de cães obtidas no período de 1985 a 2015 nos estados da PB, CE, RN, AL, PE e MG. Destas, 27 eram positivas pela HA com títulos de 1/16 a 1/1.024 (Tabelas 1 e 2). Apenas os soros com título de HA $\geq 1/32$ foram positivos no ELISA proteína-A. Embora o número de amostras analisadas tenha sido pequeno para melhor análise, pode-se admitir que a frequência de positividade pelo ELISA proteína-A é proporcional aos títulos de HA. Portanto, é possível que utilizando diluição menor dos soros o número de amostras positivas por ELISA proteína-A aumente, mas por outro lado, este procedimento poderá levar ao aumento de falso positivos.

178 amostras (126 de PE e 52 de MG) eram HA negativas ou apresentaram altos níveis de aglutinação inespecífica que não foi inibida pela HI. Na rotina de diagnóstico a frequência de aglutinação inespecífica nos soros dos cães é bastante elevada e pode ter diversas causas ligadas aos animais (saúde, dieta, alergias) ou relacionados à coleta, transporte e estocagem das amostras [15].

Inicialmente foi determinado o *cut off* para o ELISA proteína-A utilizando soros de cães negativos (não reagentes) pela HA. O *cut off* calculado pela média das DO de 10 amostras de soros + 3 vezes o desvio padrão foi 0,331[27]. Considerando que na rotina a grande parte das amostras de soros de cães apresenta alto nível de aglutinação inespecífica foi calculado outro *cut off* utilizando 30 amostras selecionadas aleatoriamente contendo soros negativos (não reagentes), soros reagentes (com reação inespecífica) e obteve-se um *cut off* de 0,408 calculado pela média das DO de 30 amostras de soros + 3 vezes o desvio padrão.

Aplicando o *cut off* mais baixo, 0,331, obtido a partir das amostras HA não reagentes dois soros HA negativos passaram a ser positivos. Não houve alteração dos resultados entre as amostras HA positivas e ELISA proteína-A negativas. Diante disso foi adotado o *cut off* de 0,408 considerando que reflete melhor a realidade da qualidade das amostras recebidas e por limitar possíveis falso positivos a partir das amostras com altos níveis de aglutinação inespecífica.

Os cães, predadores dos roedores, hospedeiros/reservatórios da peste, são capazes de adquirir a infecção pela *Y. pestis* por várias vias de infecção, seja pelas picadas de pulgas infectadas ou pela

ingestão de suas presas infectadas [28]. Experimentalmente no laboratório observou-se que os cães embora susceptíveis à *Y. pestis*, possuem um certo nível de resistência a infecção oral; pela ingestão de camundongos infectados desenvolvem um quadro clínico brando com sintomas moderados e após curto período febril (~3 dias) se recuperam completamente sem tratamento. Os animais recuperados desenvolvem anticorpos antipestosos cujo pico é atingido dentro de três a quatro semanas após a exposição e permanecem detectáveis por cerca de 300 dias [29-30]. Na natureza o tempo de exposição dos cães ao antígeno não é conhecido podendo tratar-se de uma infecção recente com anticorpos IgM ou antiga com anticorpos IgG. É geralmente admitido que uma alta proporção de animais positivos com altos títulos de anticorpos indica atividade pestosa recente [28]. Foi estimado que a amostragem de alguns poucos cães equivale a amostragem de centenas de roedores nos inquéritos sorológicos para detecção de anticorpos antipestosos [28].

Nos focos do Brasil os cães são parasitados por várias espécies de pulgas inclusive as espécies mais comuns dos humanos e dos roedores [31]. Pulgas *Ctenocephalides felis* foram fortuitamente encontradas infectadas em um gato de uma casa onde havia um surto familiar de peste [10]. A peste nos gatos nunca foi adequadamente estudada no Brasil, apesar de relatos de epizootias felinas generalizadas no passado [32] e mais recentemente houve vários casos em que títulos de anticorpos encontrados em gatos é igual ou maior do que nos cães [33-34].

Com a diminuição da atividade da peste nos focos [7,14,35] a disponibilidade de amostras positivas está se tornando cada vez mais reduzida e esta escassez de amostras positivas limita melhores comparações. A hemaglutinação emprega SNC como controle negativo e como controles positivos antissoros de coelhos imunizados no laboratório nas reações com soros de qualquer fonte [15]. Similarmente, nos testes ELISA proteína-A deve-se sempre também testar SNC e soros imunes de coelhos inoculados experimentalmente no laboratório em paralelo aos soros de outras origens para assegurar de que a reação está funcionando adequadamente.

O protocolo de rotina da HA preconiza uma triagem inicial dos soros nas diluições 1/4 a 1/32. As amostras reagentes nas diluições $\geq 1/16$ são reanalisadas em diluição $\geq 1/128$ em paralelo a prova de HI. Em geral são feitas 3-4 repetições para um diagnóstico preciso [15]. O teste ELISA proteína-A já permite uma definição dos soros (positivo/negativo) desde a triagem dispensando repetições que acarretam perda de tempo e de material.

Conclusão

O emprego do teste ELISA proteína-A, pela facilidade de execução e de interpretação devido à automação poderá ter importantes implicações práticas na metodologia das atividades de diagnóstico da peste.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Processo IBPG-0818-2.12/11), ao CNPq (Processo 305570/2011-0) e a Kátia Maria Galindo e José Dantas Sobrinho pelas reações de hemaglutinação.

Referências

1. Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. Clin Microb Rev. 10: 35-66.
2. Gage KL, Kosoy MY (2005) Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. Annu Rev Entomol. 50: 505-28.
3. Raoult D, Mouffok N, Bitam I, Piarroux R, Drancourt M (2013) Plague: history and contemporary analysis. J Infect. 66: 18-26.
4. Schneider MC, Najera P, Aldighieri S, et al. (2014) Where does human plague persist in Latin America? PLOS Negl Trop Dis. 8: e2680.
5. Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E (2008) Plague: past, present and future. PLoS Med. 5: 9-13.
6. WHO (2008) International Health Regulations. 2nded. World Health Organization, Geneva.;74.
7. Tavares C, Aragão I, Leal NC, Leal-Balbino TCA, Oliveira MBM, Oliveira GM, Almeida AMP (2012) Plague in Brazil: from now and then. Adv Exp Med Biol. 954: 69-77.
8. Vieira J, Almeida AMP, Almeida CR (1994) Epidemiologia e Controle da Peste no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 27: 51-58.
9. Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR (1985) Isolamento de *Yersinia pestis* nos focos pestosos do nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Rev Inst Med Trop São Paulo. 27: 207-218.
10. Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR, Almeida AMP (1988). Pesquisa da infecção natural por *Yersinia pestis*, em pulicídeos provenientes de focos pestosos do Nordeste do Brasil. Rev S Pub. 21: 265-267.

11. Almeida CR, Almeida, AMP, Vieira JB, Guida U, Butler T (1981) Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. *Wld Hlth Org Bull.* 59: 591-597.
12. Almeida AMP, Leal NC, Carvalho FG, Dantas-Sobrinho J, Almeida CR (1995) Plague surveillance in Brazil: 1983-1992. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 37: 511-516.
13. Aragão AI, Seoane AC, Leal NC, Almeida AMP (2002). Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1990-1999. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35: 143-148.
14. Aragão AI, Pontes RJS, Seoane ACM, Nascimento OJ, Tavares C, Almeida AMP (2007). Tendência Secular da peste no estado do Ceará, Brasil. *Cad S Publ.* 23: 715-724.
15. Chu M (2000) Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests. CDC/WHO. Geneve. 129.
16. WHO (1970) Technical Report Series, WHO Expert Committee on Plague, Fourth Report. *World Health Organization Bulletin.* 447: 23-25.
17. Shepherd AJ et al. (1984) A comparison of serological techniques for plague surveillance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 78: 771-773.
18. Almeida AMP, Ferreira LCS (1992). Evaluation of three serological tests for the detection of human plague in Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87: 87-92.
19. Lima VMF, Biazonno L, Silva AC, Corrêa APFL, Luvizotto MCR (2005). Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 25: 215-218.
20. Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr G, Pontes-De-Carvalho LC, Oliveira-Dos-Santos AJ (1996) A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 39-44.
21. Rasoamanana B, Leroy F, Boisier P, Rasolomaharo M, Buchy P, Carniel E, Chanteau S (1997) Field evaluation of an IgG anti-F1 ELISA test for the serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4: 587-591.
22. Rajerison M, Darteville S, Ralafiarisoa LA, Bitam I, Tuyet DT, Andrianaivoarimanana V, Nato F and Rahalison L (2009) Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis.* 3: e421.
23. Goudswaard J, Vander Donk JA, Noordzij A, Van Dam RH, Vaerman JP (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand. J. Immunol.* 8: 21-28.
24. Surolia A, Pain D, Khan MI (1982) Protein A: nature's universal anti-antibody. *T1BS.* 74-76.

25. Kelly PJ, Tagwira M, Matthewman L, Mason PR, Wright EP (1993). Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 299-305.
26. Ferreira RBP, Larangeira FD, Oliveira, SL, Malta CCM, Gomes CM, Bastos LB, Portela WR, Barrouin-Melo MS (2013) Teste de Elisa indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. *Pesq. Vet. Bras.* 33: 528-534.
27. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski DA (1998). A statistically defined endpoint 335 titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 221: 35-41.
28. Gage K (1999). Plague surveillance in: WHO/CDS/CSR/EDC/99.2 Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control.
29. Rust JH. Miller BE. Bahamnyar M. Marshall JD, et al. (1971 b) The role of domestic animals in the epidemiology of plague. II. Antibody to *Yersinia pestis* in sera of dogs and cats. *J Infect Dis.* 124: 527-531.
30. Barnes AM (1982). Surveillance and control of bubonic plague in the United States. *Symp Zool Soc of London.* 50: 237-270.
31. Karimi Y, Eftekahari M, Almeida CR (1974) Sur l'écologie des puces impliquées dans l'épidémiologie de la peste et le rôle éventuel de certains insectes hématophages dans son processus au nord-est du Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 67: 583-591.
32. Machiavello A, Coutinho AB (1940) A feline epizootic in Northeast Brazil. Adeno-mielloenterose-specific filtered virus. *Brazil Medical.* 8: 13-18.
33. Almeida AMP, Brasil DP, Melo MEB, Leal NC, Almeida CR (1988) Importância dos carnívoros domésticos (cães e gatos) na epidemiologia da peste nos focos do Nordeste do Brasil. *Cad S Publ.* 1: 49-55.
34. Aragão AI, Pinheiro KMA, Seoane ACM, Tavares C, Almeida AMP (2009) Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos do Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Tro.* 42: 711-715.
35. Saavedra RC & Dias JP (2011) Infecção por *Yersinia pestis* na Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44: 223-227.

Tabela 1. Distribuição por ano e por estado das amostras de soros de cães HA positivas examinadas e positivas pelo ELISA proteína-A

Ano	PB		CE		RN		AL		PE		MG		Total	
	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos
1985	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	01	0
1986	05	05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	05	05
1996	0	0	02	0	03	0	0	0	0	0	0	0	05	0
1997	0	0	0	0	0	0	03	0	0	0	0	0	03	0
2000	0	0	0	0	02	0	0	0	0	0	0	0	02	0
2002	0	0	0	0	0	0	0	0	02	0	0	0	02	0
2009	0	0	0	0	0	0	0	0	06	03	0	0	06	03
2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	01	01	01	01
2015	0	0	0	0	0	0	0	0	02	01	0	0	02	01
Total	06	05	02	0	05	0	03	0	10	04	01	01	27	10

Tabela 2. Percentual de amostras de soros de cães HA positivas examinadas e positivas pelo ELISA proteína-A em relação ao título de anticorpos hemaglutinantes

Titulo	Exam	Pos	%
1/16	08	01	12,5
1/32	12	4	33,3
1/64	02	2	100,0
1/128	04	2	50,0
1/1024	01	1	100,0
Total Examinado e positivos	27	10	37,0

7. CONCLUSÃO

- Os estudos sobre roedores e outros pequenos mamíferos nas áreas focais de peste historicamente mais importantes no Nordeste do Brasil revelaram diferenças qualitativas e quantitativas nas populações desses animais nas áreas estudadas assim como a presença de anticorpos antipestosos entre eles. A presença de anticorpos antipestosos entre animais hospedeiros/reservatórios significa que a zoonose permanece ativa nas áreas pestíferas. Portanto, a qualquer momento, mudanças ambientais, sociais ou outras desconhecidas podem desencadear a reemergência da peste nos focos brasileiros.
- Os resultados dos trabalhos sobre o teste imunoenzimático ELISA-Proteína-A poderão ter importantes implicações práticas na metodologia das atividades de diagnóstico da peste. Os ensaios com soros de coelhos experimentais e amostras de soros humanos de períodos epidêmicos e de casos esporádicos comprovaram a especificidade da técnica porque não houve reconhecimento das amostras de soro normal dos coelhos (SNC) ou dos animais inoculados experimentalmente com outras espécies de *Yersinia* nem de pacientes com aglutinação inespecífica. Em relação à sensibilidade o teste revelou-se altamente sensível com as amostras dos coelhos inoculados reconhecendo todos os soros de coelho imunizados com F1 ou diferentes cepas de peste mesmo os de baixos títulos. Entretanto com os soros humanos foi menos eficiente reconhecendo apenas soros com títulos mais altos de hemaglutinação (HA).
- Nas análises com amostras de soros de cães, animais indicadores/sentinela das atividades da infecção na natureza, a positividade pelo ELISA proteína-A também foi proporcional aos títulos de hemaglutinação e as amostras HA negativas ou apresentando altos níveis de aglutinação inespecífica foram também negativas pelo ELISA proteína-A.
- Além da facilidade de execução e de interpretação, devido à automação, o teste ELISA proteína-A contribui para um diagnóstico (positivo/negativo) desde a triagem, proporcionando economia de tempo e de material.
- Em conclusão, embora o número de amostras analisadas de soros humanos ou de cães HA positivos tenha sido pequeno para melhor avaliação, verifica-se que a frequência de positividade pelo ELISA proteína-A é proporcional aos títulos de HA. Portanto, é possível que utilizando diluição menor dos soros o número de amostras positivas por ELISA proteína-A aumente, mas por outro lado, este procedimento poderá levar ao aumento de falso positivos. O teste ELISA proteína-A oferece maior especificidade permitindo descartar as amostras com reações inespecíficas ou falso positivas desde a triagem o que repercute em grande ganho de tempo além de evitar desperdício de material.

8. PERSPECTIVAS

- Outros estudos são necessários para aprofundar o conhecimento do papel das diferentes espécies de roedores e outros pequenos mamíferos na epidemiologia da peste nos focos do país.
- Outros testes deverão ser realizados com menor diluição dos soros humanos para avaliar o limiar de detecção. Além disso, outros testes empregando outros antígenos da *Y. pestis* devem ser realizados para detectar a presença de anticorpos contra outros antígenos da bactéria ou eventualmente afastar definitivamente o diagnóstico presuntivo de peste nos pacientes suspeitos de peste benigna.

ANEXO

Anexo A: Fluxograma de notificação dos agravos sujeitos ao Regulamento Sanitário Internacional (RSI).

Figura 24. Fluxograma de notificação dos agravos sujeitos ao Regulamento Sanitário Internacional

