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

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CEPAS DE *YERSINIA PESTIS*

DOUTORANDA: MARIA BETÂNIA MELO DE OLIVEIRA
ORIENTADORA: DRa. ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA
CO-ORIENTADORA: DRa. TEREZA CRISTINA LEAL-BALBINO

RECIFE / PE – BRASIL
2006

MARIA BETÂNIA MELO DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CEPAS DE *YERSINIA PESTIS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Doutorado, Área de Concentração: Genética.

ORIENTADORA: DRA. ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA

CO-ORIENTADORA: DRA. TEREZA CRISTINA LEAL-BALBINO

RECIFE / PE – BRASIL
2006

Oliveira, Maria Betânia Melo de Oliveira
Diversidade genética em Cepas de Yersinia pestis / Maria Betânia Melo de Oliveira. – Recife: O Autor, 2006.

xiii, 93 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Genética, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Yersinia pestis – Diversidade genética 2. Loco pgm 3. Plasmídeo 4. Epidemiologia molecular I. Título.

578.5	CDU (2.ed.)	UFPE
579.34	CDD (22.ed.)	CCB – 2006 - 019

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CEPAS DE *YERSINIA PESTIS*

MARIA BETÂNIA MELO DE OLIVEIRA

BANCA EXAMINADORA

Dra. Constância Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Profa. Dra. Márcia Morais
Universidade de Pernambuco

Profa. Dra. Marise Sobreira
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Valdir Queiroz Balbino
Faculdade São Miguel

Dra. Nilma Cintra Leal
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus queridos pais, Mirian e José, o início de tudo; ao meu amado esposo, Marcílio e a nossa querida filha, Maria Beatriz, a razão do meu viver.
Dedico.

Recomeçar

"Não importa onde você parou...

Em que momento da vida você cansou...

O que importa é que sempre é possível recomeçar.

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...

É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...

Acreditar em você de novo.

Sofreu muito neste período? Foi aprendizado...

Chorou muito? Foi limpeza da alma...

Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...

Sentiu-se só diversas vezes? È porque fechaste a porta até para os anjos...

Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora..."

Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto...

Queira o melhor do melhor...

Se pensarmos pequeno...

Coisas pequenas teremos...

Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor...

O melhor vai se instalar em nossa vida.

Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura"

(Carlos Drummond de Andrade).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... III
LISTA DE TABELAS..... V
LISTA DE FIGURAS..... VI
LISTA DE ABREVIATURAS..... VIII
RESUMO..... X
ABSTRACT..... XII
INTRODUÇÃO..... 1
REVISÃO DA LITERATURA..... 3
Histórico da Peste..... 3
Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo..... 4
Epidemiologia da Peste..... 5
Diagnóstico..... 6
Diagnóstico Bacteriológico..... 7
Diagnóstico Sorológico..... 7
Diagnóstico Molecular..... 7
Tratamento, Prevenção e Controle da Peste..... 8
Agente Etiológico da Peste 8
O genoma da *Yersinia pestis*..... 9
O cromossomo da *Yersinia pestis*..... 10
Plasmídeos da *Y. pestis*..... 13
Epidemiologia Molecular..... 15

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 19
ARTIGOS..... 32
ARTIGO I:Tipagem de cepas brasileiras de *Yersinia pestis* por MLVA-PCR 33
ARTIGO II: Comparação das cepas de *Yersinia pestis* de dois focos de peste no Estado do Ceará, Brasil, pelo MLVA-PCR..... 56
ARTIGO III: Diversidade genética em cepas de *Yersinia pestis* de um surto de peste no Estado da Paraíba..... 70
ARTIGO IV: The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*..... 84
CONCLUSÕES..... 91
ANEXOS..... 93

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos vão para as pessoas que me acompanharam e me incentivaram, estando ou não diretamente ligadas ao meu trabalho.

À ***Drª Alzira Almeida****, por sua orientação, compreensão, amizade e apoio recebido durante todas as etapas deste trabalho. Seus ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Toda minha admiração!*

À ***Drª Tereza Cristina Leal-Balbino****, minha querida amiga e co-orientadora, a qual serei eternamente grata pela amizade conquistada e obtenção deste título. Você mais do que ninguém sabe o caminho que percorri para chegar até aqui e sua contribuição para realização deste trabalho. Obrigada por tudo, amiga!*

À ***Drª Nilma Cintra Leal****, minha conselheira e amiga obrigada por todo apoio, incentivo e sugestões além da agradável convivência.*

À amiga, ***Marise Sobreira****, pela receptividade, atenção e carinho sempre demonstrado ao longo deste doutorado e por ter-me batizado carinhosamente por Maricota, hoje tão popular por todos.*

Ao ***Drº Valdir Balbino*** *pelas sugestões e análises das seqüências.*

Ao ***Drº Osvaldo Pompílio*** *pelas sugestões e contribuições.*

Aos colegas do laboratório de microbiologia: ***Ana Paula, Cariri, Christian, Daniele, Éden, Franklin Bispo, Franklin Magalhães, Gerlane, Isabelle, Josiane, Júnior, Karina, Mariana, Marília, Manuela, Patrícia, Pollyana, Rodrigo, Rosane, Soraya, Tâmara, Wagner e Wellington,*** *pelo agradável convívio. Em especial, aos amigos* ***Vladimir*** *e* ***Paloma*** *pela ajuda nas análises das seqüências e companhia nos últimos momentos da tese.*

Ao "meu querido grupo e amigos de trabalho": ***Mirele Regina****, por participar do início, meio e fim deste trabalho contribuindo eficientemente na elaboração deste trabalho, muito obrigada; ao* ***Thieres Campos*** *por sua participação e execução em alguns experimentos e ajuda nas apresentações e a* ***Fabiana Laura*** *por sua eficiência e, sobretudo sua alegria fatores essenciais para o andamento do trabalho.*

Aos funcionários do laboratório de microbiologia do CPqAM, em especial, ***Issac "Newton", Silvana Santos e Yara Nakasawa*** *pela ajuda e agradável convívio.*

Aos funcionários da esterilização do CPqAM: ***Edson, Nelson e Rita*** *pelo eficiente trabalho.*

Ao ***Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães*** *pela realização dos experimentos em suas instalações.*

*À **Coordenação do Doutorado em Ciências Biológicas** (UFPE), Profa.**Suely Lins Galdino** pelo empenho na condução do curso, e às secretárias **Adenilda Eugênia e Liane Salomé** pela disponibilidade e apoio.*

***Ao corpo docente do Doutorado em Ciências Biológicas** (UFPE), pela oportunidade de aprender sempre um pouco mais.*

*A todos os **colegas de turma do Curso de Doutorado**, em especial à amiga **Neide Fhinohara**, pelos bons momentos vividos durante esse curso.*

*Aos meus **pais irmãos e sobrinhos** pelo apoio e incentivo constante, obrigada por acreditarem em mim!*

*Ao meu esposo; **Marcílio**, que sempre esteve ao meu lado apoiando-me e incentivando-me nos momentos mais difíceis, obrigada pela ajuda, amor e carinho!*

*A minha querida filha; **Maria Beatriz**, que chegou durante o doutorado e me proporciona diariamente a alegria de receber seu belo sorriso. A você, filha, dedico este trabalho.*

*Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento CNPq** pela bolsa de doutorado concedida.*

*E finalmente, gostaria de agradecer ao responsável por tudo isto acontecer, ao meu **DEUS**, fonte de toda sabedoria e amor.*

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela I Características gerais de cepas de *Y. pestis* de diferentes focos de peste..... **44**

Tabela II Perfil genotípico em cepas de *Y. pestis* isoladas de outros focos de peste no mundo..... **45**

Tabela III Perfil genotípico das cepas de *Yersinia enterocolitica*..... **46**

Tabela IV Perfil genotípico das cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*... **47**

Tabela V Características dos VNTRs analisados em cepas de *Y. pestis* do NE do Brasil..... **48**

Tabela VI Perfil genotípico das cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes focos de peste..... **49**

ARTIGO II

Tabela I Características gerais de cepas de *Y. pestis* isoladas de dois focos de peste do Estado do Ceará..... **64**

ARTIGO III

Tabela I Perfis genotípicos de cepas de *Y. pestis* isoladas de um surto de peste no Estado da Paraíba analisadas pelo MLVA-PCR..... **78**

Tabela II Características das cepas P. CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 e suas derivadas analisadas pelo MLVA-PCR..... **79**

ARTIGO IV

Table I Primers used in PCR analysis..... **87**

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura1 Esquema representativo de uma seqüência repetitiva em tandem..... **31**

ARTIGO I

Figura 1 Gel de agarose a 2,5% representativo das cepas de *Y. pestis*..... **51**

Figura 2 Dendograma construído baseado na análise das 31 cepas brasileiras de *Y. pestis*..... **52**

Figura 3 Mapa do estado de Pernambuco indicando os diferentes municípios estudados pertencentes a três focos de peste **53**

Figura 4 Gel de agarose a 2,5% representativo das cepas de *Y. enterocolitica*..... **54**

Figura 5 Gel de agarose a 2,5% representativo das cepas de *Y. pseudotuberculosis*..... **55**

ARTIGO II

Figura 1 Gel de agarose 2,5% representativo das cepas de *Y. pestis* . **66**

Figura 2 Dendograma construído baseado na análise de 43 cepas de *Y.pestis* isoladas de dois focos de peste no Ceará..... **67**

Figura 3 Distribuição espacial dos perfis genotípicos encontrados em cepas de *Y. pestis* na Serra de Baturité estado do Ceará **68**

Figura 4 Distribuição espacial dos perfis genotípicos encontrados em cepas de *Y. pestis* na Serra da Ibiapaba do estado do Ceará **69**

ARTIGO III

Figura 1 Gel de agarose a 2,5% representativo das amplificações por PCR dos VNTR..... **80**

Figura 2 Dendograma construído baseado na análise de cepas de *Y. pestis* isoladas do surto de peste na Paraíba..... **81**

Figura 3 Mapa do estado da Paraíba destacando os três municípios estudados e os perfis genotípicos encontrados em cada município **82**

Figura 4 Gel de agarose a 2,5% das cepas P. CE 882, P. EXU 340 e P. Peru

375 e suas derivadas..... **83**

ARTIGO IV

Figure 1 Eschematic representation of the *pgm* locus of *Y. pestis*..... **86**

Figure 2 PCR products from *primers* directed to the gens..... **88**

Figure 3 Hybridization with the HmsH probe and DNA from strain P. CE 882 as positive control..... **88**

Figure 4 PCR products from primers direted to the gene and strain P CE 882R..... **88**

Figure 5 PCR products from the primers directed to the gene *psn*…… **89**

Lista de Abreviaturas

AVC	-Agar Vermelho Congo
BAB	-Blood Agar Base
BHI	-Brain Heart Infusion
BLAST	-Basic Local Alignment Search Tool
CPqAM	-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	-Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	-desoxirribonucletotídeo trifosfato
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	-Fundação Nacional de Saúde
Fur	-Ferric Uptake Regulation
HA	-Hemaglutinação
HPI	-Ilha de patogenicidade
IS	-Seqüência de Inserção
kb	-Kilobases
mg	-Miligrama
ml	-Mililitro
MLVA	-Análise de VNTR
mM	-Milimolar
ng	-Nanograma
nM	-Nanomolar
OMS	-Organização Mundial de Saúde
ORF	-Open Reading Frame
pb	-Pares de base
PCR	-Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	-Eletroforese em gel de campo pulsado
pH	-Potencial de hidrogênio
RAPD	-Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	-Restriction Fragment Length Polymorphisms
rpm	-Rotações por minuto

rRNA	-RNA ribossomal
SRP	-Serviço de Referencia em Peste
STE	-SDS 2,5%, Tris-HCl 10mM, EDTA 0,25M
TE	-Tris-HCl 1mM; EDTA 10mM
TBE	-Tris-botrato, ácido bórico, EDTA
tRNA	-RNA transportador
UV	-Ultra Violeta
VNTR	-Número Variável de Repetições em Tandem
μM	-Micromolar

RESUMO

A *Yersinia pestis*, bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, é uma espécie muito homogênea quando observada pelos métodos fenotípicos: apresenta apenas um sorotipo, um fagotipo e um biótipo subdividido em três biovars ou variedades geográficas. Com a introdução de técnicas moleculares os estudos de tipagem em cepas de *Y. pestis* foram significativamente aprofundados contribuindo para rastrear a origem de novas cepas e detectar o surgimento de novos clones. Este trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética entre cepas de *Y. pestis* analisando regiões específicas do genoma desta bactéria suscetíveis a diferentes mecanismos de mutação. Para isto foram empregadas duas abordagens: 1) análise do loco *pgm* em três cepas altamente virulentas, isoladas de humanos e 2) análise de VNTRs (MLVA-PCR) como marcador para reconhecer e rastrear os clones circulantes de *Y. pestis* nos focos de peste do Nordeste do Brasil. Foram observadas diferenças na estabilidade do loco *pgm* das cepas estudadas (duas cepas brasileiras: P. CE 882 e P. Exu 340 e uma de outro foco sul-americano: P. Peru 375). As culturas derivadas da P. Exu 340 e P. Peru 375 apresentaram alterações no loco *pgm* após repiques sucessivos no meio agar vermelho Congo, enquanto que a P. CE 882 não apresentou. Nos ensaios do MLVA-PCR todos os seis locos estudados foram amplificados em todas as cepas de *Y. pestis.* Os locos VNTR1, VNTR5 e VNTR6 apresentaram padrões de amplificação semelhantes em todas as cepas de *Y. pestis* das diferentes regiões geográficas. Entretanto, os padrões dos locos VNTR2, VNTR3 e VNTR4 foram distintos para algumas cepas. Foi verificado diversidade no número de alelos por loco variando de três (para o VNTR1 e o VNTR3), quatro (para o VNTR2) e cinco (para o VNTR4), enquanto para os VNTR5 e VNTR6 o número de alelos não variou. A análise do tamanho e o número de *repeats* para cada VNTR permitiu identificar 23 genótipos nas 105 amostras de *Y. pestis* analisadas. Alguns destes genótipos apresentaram uma ampla distribuição geográfica, enquanto outros foram específicos de uma determinada região. Para verificar a estabilidade dos VNTRs "*in vitro*", três cepas de *Y. pestis* foram submetidas a repiques sucessivos e as culturas derivadas foram analisadas. As cepas parentais e as culturas derivadas revelaram perfis idênticos com os seis locos estudados. Cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* foram incluídas no trabalho para comparação. As cepas de *Y. enterocolitica* amplificaram todos os locos, com exceção do VNTR1 onde nenhum segmento foi amplificado. Com os outros locos os padrões de amplificação obtidos foram semelhantes aos encontrados nas cepas de *Y. pestis.* As cepas de *Y.*

pseudotuberculosis apresentaram padrões de amplificação semelhantes aos encontrados em cepas de *Y. pestis* para os locos VNTR1 e VNTR3 e distintos para os demais locos. Os resultados obtidos pela análise de diferentes regiões ou locos (*pgm* e VNTRs) do genoma da *Y. pestis* demonstraram diversidade genética intraespecífica nessa espécie os quais contribuirão para estudos epidemiológicos, taxonômicos e evolutivos futuros.

Palavras chave: *Yersinia*, loco *pgm*, VNTRs, Epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Yersinia pestis, a Gram-negative bacterium of the Enterobacteriaceae family, is a phenotypically very homogeneous species: it has only one serotype, one phagetype and one biotype subdivided in three biovars or geographic varieties. Development of molecular techniques contributed to improve *Y. pestis* typing allowing to track the dispersion of one strain and to detect the origin of a new clone. This work had as objective to verify the genetic diversity among *Y. pestis* strains through the analysis of specific loci susceptible to different mechanisms of mutation in the genome of this bacterium. Two different approaches had been used: 1) analysis of the *pgm* locus in three human highly virulent strains, and 2) analysis of VNTRs (MLVA-PCR) as a marker to recognize and to track *Y. pestis* clones circulating in the plague foci of northeast of Brazil. Through serial subcultures in Congo red agar plates (CRA) differences in the stability of the strains had been observed: one strain, P. CE 882, shown to be highly stable. The other two strains (P. Exu 340 and P. Peru 375) were unstable revealing modifications in the *pgm* locus of the derived cultures. By the MLVA-PCR assays all the six loci studied had been amplified in all *Y. pestis* strains. For the VNTR1, VNTR5 and VNTR6 loci the amplification pattern had been similar in all strains of *Y. pestis* from the different geographic regions. However, with VNTR2, VNTR3 and VNTR4 loci the amplification patterns in some strains were distinct. Diversity in the number of alleles in the loci was also found, varying from three (for VNTR1 and VNTR3), four (for VNTR2) and five (for VNTR4). The analysis of the size and the number of repeats of each VNTR allowed identifying 23 genotypes in the 115 *Y. pestis* samples analyzed. Some of these genotypes presented a wide geographic distribution, while others were specific of one region. To verify the stability *in vitro* of the VNTRs three strains of *Y. pestis* had been submitted to serial subcultures and the derived cultures had been analyzed. Parental strains and derived cultures revealed identical profiles of the six loci studied. Samples from *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* were included in this work for comparison. In the *Y. enterocolitica* strains all but the VNTR1 loci had amplified. With the other loci the patterns of amplification had been similar to the ones found in the *Y. pestis* strains. The *Y. pseudotuberculosis* strains presented amplification patterns similar to the ones found in the *Y. pestis* strains with the VNTR1 and

VNTR3 loci but different for the other loci. The results obtained by the analysis of different regions or loci (*pgm* and VNTRs) of *Y. pestis* have demonstrated intra specific genetic diversity in this species and will contribute for future epidemiological, taxonomic and evolutive studies.

Key words: *Yersinia*, *pgm* loci, VNTRs, molecular epidemiology.

INTRODUÇÃO

A *Yersinia pestis* é o agente causador da peste, doença primária dos roedores usualmente transmitida por pulgas que podem infectar o homem. O genoma da *Y. pestis* é constituído de um cromossomo de aproximadamente 4.650 kb e três plasmídeos prototípicos, importantes para a virulência: pPst ou pCP1 (± 9.5 kb), pFra ou pMT1 (± 100 kb) e pYV ou pCD1 (± 70kb). Devido à elevada plasticidade encontrada nas seqüências do genoma dessa bactéria foi possível verificar que regiões suscetíveis a diferentes mecanismos de mutação podem ser utilizadas como alvo para estudar a diversidade intraespecífica nessa espécie. Através dos resultados do sequenciamento constatou-se que o genoma da *Y. pestis* não é completamente uniforme como se pensava inicialmente, refletindo a adaptação da bactéria a diferentes nichos ecológicos.

Dentre as regiões do genoma de *Y. pestis* suscetíveis à mutação destacamos os locos *pgm* e VNTR. O loco *pgm* é uma região do cromossomo de *Y. pestis* constituído de dois segmentos: o "segmento de aquisição de ferro" que é considerado uma "Ilha de Patogenicidade" ou HPI (*High-Pathogenicity-Island*) e o "segmento de pigmentação". Esta região é altamente sujeita a deleção acarretando diferenças fenotípicas e na patogenicidade das culturas.

Os VNTRs correspondem a seqüências repetitivas freqüentemente em tandem, polimórficas devido a diferenças no número de unidades repetidas. Essas diferenças podem ser observadas através da Análise de Múltiplos Locos do número Variável de repetições em tandem pela Reação em Cadeia da Polimerase (MLVA-PCR) utilizando *primers* específicos que flanqueiam regiões repetitivas do genoma. Análises dos VNTRs permitiram detectar variações genômicas entre cepas intimamente relacionadas de várias bactérias patogênicas, inclusive a *Y. pestis* e auxiliaram em estudos epidemiológicos na identificação de fontes de infecção da peste.

Estudos de tipagem molecular utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD, RFLP-IS100, PCR-ribotipagem) em cepas brasileiras de *Y. pestis* demonstraram um baixo poder discriminatório revelando, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre cepas provenientes de diferentes fontes, ano e local de isolamento.

Este trabalho teve como objetivo geral verificar a diversidade genética em cepas de *Y. pestis* através da análise dos locos *pgm* e VNTR e como objetivos específicos: 1) verificar as alterações genotípicas e fenotípicas no loco *pgm* de três cepas de *Y. pestis* altamente virulentas isoladas de humanos e culturas derivadas obtidas através de cultivos sucessivos; 2) avaliar a mobilidade da HPI e do segmento de pigmentação nas culturas parentais e derivadas; 3) comparar o polimorfismo dos VNTRs em cepas brasileiras de *Y. pestis,* cepas de outros focos de

outros países e das outras espécies patogênicas do gênero *Yersinia* e 4) verificar a estabilidade *in vitro* dos VNTRs através de repiques seriados em laboratório.

REVISÃO DA LITERATURA

Histórico da Peste

O agente etiológico da peste foi identificado pela primeira vez em 1894, por Alexander Yersin e em 1898 foi descoberto o papel da pulga na transmissão da doença por Louis Simond (GAGE e KOSOY, 2005).

A peste é uma zoonose primária dos roedores usualmente transmitida pelas picadas de pulgas que podem infectar o homem. No passado, a peste causou uma devastação social em grande escala jamais relatada para qualquer outro agente infeccioso. Apesar de várias doenças terem sido erroneamente classificadas como peste desde a antiguidade, durante a era cristã, três grandes pandemias foram bem caracterizadas (GAGE e KOSOY, 2005).

A primeira pandemia, denominada "Peste de Justiniano" (542-605 d.C) teve início na África Central se estendeu para o Egito e estima-se que chegou a matar 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia ou Peste Negra teve início na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia. A terceira pandemia ou Pandemia Contemporânea teve início na China estendendo-se para Hong Kong em 1894 e rapidamente se espalhou pelo mundo através do transporte marítimo para os Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Madagascar (POLLITZER, 1954). Segundo MOLLARET (1989) a expansão desta pandemia terminou com a Segunda Guerra Mundial, devido à substituição dos antigos navios pelos novos a prova de ratos. No entanto, esta pandemia deixou focos endêmicos em todos os continentes, exceto na Austrália.

A peste chegou ao Brasil em 1899, durante a última pandemia, pelo porto de Santos no Estado de São Paulo. Em seguida atingiu várias cidades litorâneas (peste portuária), e penetrou pelas cidades do interior (peste urbana) onde foi eliminada por medidas sanitárias adequadas, mas fixou-se na zona rural (peste silvestre) entre os roedores silvestres (WHO, 1965).

Situação Atual da Peste no Brasil e no Mundo

A peste continua sendo uma ameaça em grandes áreas do mundo: América do Norte, no oeste dos EUA; América do Sul, no Brasil, Equador, Peru e Bolívia; África, principalmente em Madagascar; Ásia, na China, Laos, Myanmar, Vietnam e Índia e sudeste da Europa, próximo ao mar Cáspio, com focos na Federação Russa (WHO, 2004).

Em 2003, ocorreram 2.118 casos de peste em nove países, incluindo 182 mortes, sendo a África o continente mais atingido, com 2.091 casos e 180 mortes, seguido da Ásia com 26 casos e duas mortes e Américas com um caso curado. Estes valores são considerados, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), provavelmente menores do que os números reais; pela resistência de alguns países em divulgar os casos de peste, pela falta de diagnóstico e principalmente pela confirmação laboratorial que na maioria dos casos é ausente (WHO, 2004).

No Brasil, existem duas áreas de foco de peste: o da região Nordeste e o foco da Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro. O foco do Nordeste está localizado na região semi-árida do Polígono das Secas, que se estende do Estado do Ceará ao Norte de Minas Gerais. Estes focos estão situados em regiões serranas como a 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), na Serra de Triunfo (Paraíba e Pernambuco), Planalto Oriental (Bahia) e piemonte da Chapada Diamantina (Minas Gerais). Ainda existe outra zona pestosa no Estado de Minas Gerais, fora do Polígono das Secas, no Vale do Rio Doce. O foco da Serra dos Órgãos abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, do Estado do Rio de Janeiro (FUNASA, 2002a).

Os focos de peste do Nordeste do Brasil produziam até meados da década de 80, de 20 a 100 casos anualmente, principalmente os dos estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. A partir de então, houve um decréscimo substancial do registro de casos de peste. Os últimos eventos significativos de peste humana ocorreram nos estados do Ceará e Paraíba, nos anos de 1980. Durante a última década, alguns casos humanos suspeitos clinica e epidemiologicamente ainda foram notificados no Ceará e na Bahia. Contudo, somente três deles, ocorridos no Ceará, foram confirmados, dois por exame sorológico, em Guaraciaba do Norte, e um por isolamento da bactéria, em Ipu. Após oito anos de ausência de casos humanos no Brasil houve o registro de um

caso de peste humana no Estado do Ceará, em fevereiro de 2005, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos (ALMEIDA *et al.,* 2005).

Em Minas Gerais e no Rio de Janeiro não há notificação de casos humanos há décadas e é raro encontrar anticorpos antipestosos nos animais-sentinela (FUNASA, 2002a; VIEIRA e COELHO, 1998).

Epidemiologia da Peste

A peste é primordialmente uma zoonose de roedores e sua transmissão ocorre principalmente pela picada da pulga infectada (a transmissão exige determinadas condições de temperatura e umidade) que podem infectar outros animais (coelhos, camelos, cães, gatos). O homem contamina-se ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas (PERRY e FETHERSTON, 1997).

A principal fonte de infecção da peste na natureza são os roedores e estima-se que cerca de 200 espécies estejam envolvidas no ciclo epidemiológico. No Brasil, os principais roedores envolvidos no ciclo epidemiológico da peste pertencem aos gêneros: *Bolomys, Calomys, Oligoryzomys, Oryzomys, Galea, Trychomys* e *Rattus*. As pulgas são vetores-reservatórios do bacilo da peste. Nos focos do Brasil *Polygenis bohlsi jordani* e *P. tripus* são os principais vetores da peste entre os roedores. *Xenopsylla cheopis* e *Pulex irritans* também participam da transmissão (FUNASA, 2002b).

A transmissão entre humanos pode acontecer por aerossóis na forma pneumônica, por acidentes com tecidos e materiais contaminados em trabalho de campo ou laboratório, ou até na utilização da bactéria como agente de guerra biológica (GAGE e KOSOY, 2005; PERRY e FETHERSTON, 1997). A penetração do bacilo da peste no hospedeiro pode ocorrer pela via sanguínea, pela pele, pela conjuntiva ocular ou através das mucosas respiratórias e digestivas. A inoculação do bacilo pela conjuntiva ocular determina a peste septicêmica, enquanto as vias percutânea e subcutânea reproduzem a peste bubônica, já pela via respiratória desenvolve-se a peste pulmonar (PERRY e FETHERSTON, 1997). A peste humana pode apresentar três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica. A peste bubônica é a mais comum no Brasil (FUNASA, 2002a). Esta forma caracteriza-se pela tumefação dos linfonodos superficiais (bubões) principalmente os localizados nas regiões axilar, inguino-crural e cervical. A sintomatologia da forma bubônica é: febre alta, dor de cabeça, calafrios e dores generalizadas. O

doente ainda pode apresentar complicações intestinais: náuseas, vômitos e diarréias (FUNASA, 2002a).

A peste septicêmica geralmente aparece na fase terminal da peste bubônica não tratada. Geralmente não há reações ganglionares visíveis, é caracterizada pela presença do bacilo no sangue. Clinicamente, a peste septicêmica assemelha-se às septicemias causadas por outras bactérias Gram-negativas. Os sintomas são: febre, dor de cabeça, mal estar e distúrbios gastrointestinais. Essa forma tem um alto grau de letalidade (30 a 50%) quando não tratada (FUNASA, 2002a).

A peste pneumônica é a forma mais grave da doença, devido ao seu quadro clínico, sua alta letalidade e seu alto potencial de contágio, podendo provocar epidemias. Pode ser secundária a peste bubônica ou septicêmica por disseminação hematógena. Tem início com um quadro infeccioso grave de evolução rápida, com abrupta elevação térmica, calafrios, arritmia, hipotensão, náuseas, vômitos e perturbação mental. Inicialmente os sinais e sintomas pulmonares são discretos e ausentes, só depois surgem dores no tórax, respiração curta e rápida, expectoração sanguinolenta, rica em bacilos pestosos. Se não tratada precocemente, surgem os sintomas de delírio e coma, podendo causar a morte (FUNASA, 2002a).

Além dessas formas graves existe uma forma benigna ou ambulatorial, com discreto comprometimento ganglionar, febre baixa e cura espontânea é a chamada peste benigna "pestis minor" (FUNASA, 2002a).

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da peste pode ser realizado por técnicas bacteriológicas e sorológicas. Excepcionalmente são empregadas técnicas moleculares. O diagnóstico bacteriológico consiste em fazer o isolamento e a identificação da bactéria em amostras de material de origem humana (aspirado de bubão, sangue, escarro) de animais (baço, fígado, sangue, medula dos fêmures) e de pulgas. O diagnóstico sorológico consiste na detecção de anticorpos antipestosos e é realizado em soro humano, dos roedores e outros mamíferos. O diagnóstico molecular consiste na identificação de genes de virulência presentes nos três plasmídeos e/ou no cromossomo da *Y. pestis.* Para esse tipo de diagnóstico laboratorial usam-se amostras de material clínico ou animal (CHU, 2000).

Diagnóstico Bacteriológico

Exame Direto

As técnicas utilizadas para o diagnóstico bacteriológico por exame direto são: coloração pelo azul de metileno (Azul de Loffler), corante de Wayson, ou o método de Gram. As análises são realizadas utilizando esfregaços de fluído de bubão, amostras de sangue, medula e vísceras dos roedores (CHU, 2000).

Cultura

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

Diagnóstico Sorológico

Para o diagnóstico sorológico é utilizada a técnica de hemaglutinação (HA). Essa técnica utiliza hemáceas de carneiro sensibilizadas com o antígeno capsular F1, da *Y. pestis,* para detecção de anticorpos em soros humanos, de roedores e de carnívoros (CHU, 2000).

Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular é uma alternativa para a identificação dos genes de virulência presentes nos três plasmídeos prototípicos e no cromossomo da *Y. pestis* em pulgas, material de roedores ou humano. Esses métodos estão baseados principalmente na técnica de PCR e suas variações: Nested-PCR (LEAL *et al.,* 1996), Multiplex-PCR (LEAL e ALMEIDA, 1999) e PCR em Tempo Real (LOIEZ *et al*., 2003).

Tratamento, Prevenção e Controle da Peste

O uso de antimicrobianos apropriados reduz significativamente a mortalidade pela peste bubônica. A forma pneumônica e septicêmica, também respondem à antibioticoterapia, desde que os pacientes sejam tratados precocemente. Os antibióticos de escolha para o tratamento da peste são: estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclinas e sulfamidas. Os quimioterápicos gentamicina, doxiciclina e a ciprofloxina também se mostraram eficazes no tratamento desta doença. Embora os testes laboratoriais demonstrem sensibilidade da *Y. pestis* à penicilina, esta é completamente ineficaz "in vivo" (FUNASA, 2002a; INGLESBY *et al*., 2000).

Em Madagascar foi isolada uma cepa de *Y. pestis* com resistência aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da peste (cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, além dos antimicrobianos alternativos, como a ampicilina, canamicina, espectinomicina, neomicina e minociclina). Esta resistência foi atribuída à aquisição de um plasmídio (pIP1202) contendo genes de resistência. Esta característica por ser plasmidial pode ser transmitida para outras cepas (GALIMAND *et al*., 1997).

O controle dos focos de peste é realizado pela eliminação das pulgas com inseticidas apropriados, a desratização, e a anti-ratização que consiste da destruição de abrigos e alimentação para os roedores, nas áreas endêmicas de peste (FUNASA, 2002b).

Agente Etiológico da Peste

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

A *Y. pestis* se apresenta em microscopia óptica como um bacilo curto, ovóide (0,5 a 0,8 µm de diâmetro e de 1 a 3 µm de comprimento) e de coloração bipolar (extremidades escuras). É uma bactéria aeróbia ou anaeróbia facultativa, cresce bem em meios usuais a 28ºC, pH entre 5 e

9, sendo imóvel, porém resistente ao frio, conserva-se em cadáveres e sobrevive em dejetos de pulgas (PERRY e FETHERSTON, 1997).

A *Y. pestis* é muito homogênea, caracteriza-se por apresentar apenas um sorotipo, um fagotipo e um biotipo com três biovar ou variedades geográficas, identificadas de acordo com a capacidade de fermentar o glicerol e reduzir os nitratos a nitritos: Antiqua ou Continental (glicerol+, nitrato+), Medievalis (glicerol+, nitrato-) e Orientalis ou Oceânica (glicerol-, nitrato+). Os biovars foram associados às três últimas pandemias e não diferem quanto ao nível de patogenicidade, nem quanto à forma clínica da doença que produzem (DEVIGNAT, 1951).

O genoma da *Yersinia pestis*

O genoma da *Y. pestis* é composto de um cromossomo e três plasmídeos, importantes para virulência: pPst ou pCP1, pFra ou pMT1 e pYV ou pCD1. O sequenciamento do genoma completo de três cepas: CO92 (PARKHILL *et al*., 2001), KIM (DENG *et al*., 2002) e 91001 (SONG *et al*., 2004) demonstraram que o genoma dessa bactéria sofreu grande fluxo gênico através da aquisição de genes de outras bactérias e vírus, sugerindo uma grande plasticidade nas seqüências, resultado de rearranjos genômicos, como translocações e inversões. Diferenças no número de genes, de operons rRNA e elementos de inserção entre as cepas seqüenciadas foram observadas.

Devido ao pequeno tamanho do genoma bacteriano, a aquisição de genes pode ser contrabalanceada com a perda da atividade de alguns genes constituindo, portanto, os pseudogenes, encontrados com alta freqüência no genoma das cepas de *Y. pestis* já seqüenciadas (SONG *et al*., 2004; DENG *et al*., 2002; PARKHILL *et al*., 2001).

O genoma da *Y. pestis* contém um elevado número de elementos ou seqüências de inserção chamadas, IS. Esses elementos são pequenos segmentos de DNA bacteriano capazes de se inserir em múltiplos sítios de uma molécula alvo participando de rearranjos cromossômicos causando inserções, deleções e recombinações (HUANG *et al*., 2002; MOTIN *et al*., 2002). No genoma da cepa KIM foram encontrados quatro tipos de IS: a IS-*1541* é a mais abundante, seguida da IS-*100*, IS-*285* e IS-*1661* (DENG *et al*., 2002).

No genoma da *Y. pestis* também existem seqüências repetitivas, os VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) classificadas como micro e minissatélites. LE FLÈCHE *et al*., (2001) identificaram 63 minissatélites localizados no genoma dessa bactéria.

As alterações genéticas detectadas no genoma da *Y. pestis*, incluindo aquisição e deleção de genes, rearranjos e translocações refletem a evolução necessária para esta espécie ocupar diferentes nichos ecológicos (ANISIMOV *et al*., 2004).

O genoma da *Y. pestis* possui cerca de 90% de homologia genética com o genoma da *Y. pseudotuberculosis*, apesar destas duas espécies estarem associadas a quadros clínicos bastante distintos. Enquanto a *Y. pseudotuberculosis* causa transtornos entéricos raramente fatais e é transmitida exclusivamente pela via oral-fecal, a *Y. pestis* adquiriu a capacidade de ser transmitida por um artrópode-vetor (pulga) e pode ser letal. Estas diferenças podem ser justificadas pela presença dos dois plasmídeos específicos em *Y. pestis*, pFra e pYV, que teriam sido adquiridos horizontalmente, e da inativação de alguns genes nessa espécie como os genes *ail, inv e yadA*, não necessários para sobrevivência da *Y. pestis*, no entanto importantes para *Y. pseudotuberculosis* na adesão e translocação da barreira intestinal (ACHTMAN, 2004; ACHTMAN *et al*., 1999).

O cromossomo da *Yersinia pestis*

O cromossomo da *Y. pestis* tem aproximadamente 4.650 kb com um conteúdo médio de GC de 47, 46% (SONG *et al*., 2004; DENG *et al*., 2002; PARKHILL *et al*., 2001). Numerosos genes estruturais e reguladores que codificam para funções relacionadas ao metabolismo e patogenicidade foram identificados no cromossomo da *Y. pestis* assim como alguns genes inativados como o *ail* e *inv.*

Loco *pgm*

No cromossomo da *Y. pestis* foi identificada uma região de 102 kb, chamada loco *pgm*, relacionada à virulência e a captação de ferro (FETHERSTON *et al*., 1992). Várias características da *Y. pestis* foram associadas ao loco *pgm*, entre as quais destacam-se: 1) capacidade de produzir um sideróforo yersiniabactina (Ybt); 2) habilidade da célula em absorver pigmento e 3) possibilidade de causar infecção letal nos animais em laboratório após injeção subcutânea.

O ferro é um elemento essencial para o crescimento bacteriano por desempenhar importantes funções nas reações enzimáticas e metabólicas como cofator ou grupo prostético.

Entre as bactérias patogênicas, o sucesso da estabilização da doença nos hospedeiros mamíferos depende da habilidade da bactéria invadir o organismo hospedeiro e adquirir ferro. Nos mamíferos o ferro é encontrado principalmente na hemoglobina, mioglobina e ferritina (BAGG e NEILANDS, 1987). A *Y. pestis* quando presente em meio pobre em ferro desenvolve sistemas elaborados para captação de ferro: 1) o sistema de transporte yersiniabactina (Ybt), 2) o sistema *hmu* e 3) o sistema Yfe.

Em muitas bactérias, a regulação do ferro é mediada por um repressor altamente conservado denominado Fur (*ferric uptake regulation*) que age como um regulador negativo na transcrição na presença de ferro. O gene *fur* que codifica esta proteína está presente nas três yersínias patogênicas (STAGGS e PERRY, 1992).

O loco *pgm* corresponde a uma grande região instável do cromossomo da *Y. pestis,* constituída de dois segmentos físico e funcionalmente distintos: um segmento de ~35kb denominado "segmento de aquisição do ferro", onde se encontram genes envolvidos na biossíntese do sideróforo yersiniabactina (Ybt) que é considerado uma ilha de patogenicidade (HPI) e um "segmento de pigmentação", *hms*, responsável pelo fenótipo de pigmentação (Pgm_+) das colônias crescidas em meio agar vermelho Congo (AVC), (CARNIEL, 2001; FETHERSTON *et al*., 1992).

As ilhas de patogenicidade (HPI) são assim denominadas por apresentarem vários genes relacionados a patogenicidade. Caracteristicamente, as ilhas de patogenicidade são bordeadas de um lado pelo gene do tRNA e menos freqüentemente o outro lado são flanqueadas por seqüências de inserção. Estas regiões são freqüentemente instáveis e podem sofrer deleções. As ilhas de patogenicidade apresentam um conteúdo GC diferenciado do encontrado no restante do cromossomo do hospedeiro, sugerindo que se originaram por transferência horizontal entre diferentes gêneros bacterianos (HACKER *et al*., 1997).

A HPI da *Y. pestis* contém vários genes envolvidos na biossíntese, regulação e transporte da yersiniabactina, e o loco *fyuA* que codifica um receptor da yersiniabactina e da bacteriocina pesticina. Este segmento também contém genes que codificam seqüências de inserção, como a IS-*100* (RAKIN *et al*., 1994).

Inicialmente, pensava-se que o loco *pgm* era deletado em bloco (FETHERSTON *et al*., 1992; LUCIER e BRUBAKER, 1992). Entretanto, ITEMAN *et al.* (1993) encontraram três tipos de culturas: Pgm+/ *irp2*+; Pgm-/*irp2*-; Pgm-/*irp2*+. Estas culturas provavelmente sofreram deleções, ou do loco *pgm* em bloco, originando as colônias Pgm-/*irp2*- ou somente do loco *hms*, originando as colônias Pgm-/*irp2+,* sugerindo que o segmento de pigmentação é móvel e independente.

Operon *hms*HFRS

O loco *hms* é um *operon* policistrônico, *hms*HFRS, constituído por quatro genes *hmsH HmsF, hmsR e HmsS,* responsáveis pela estocagem de heme ou análogos estruturais, como o corante vermelho Congo, permitindo a formação de colônias pigmentadas (Pgm+) em meios de cultura apropriados. A pigmentação resulta da acumulação de heme na membrana externa. O fenótipo Pgm+ só é expresso em temperaturas abaixo de 28°C (Pendrak e Martinez, 1993).

Células Pgm- são capazes de utilizar heme como fonte de ferro, porém não podem estocá-lo. As culturas não pigmentadas quando injetadas pela rota periférica, exibem virulência reduzida em camundongos, exceto quando suplementadas com ferro (BURROWS e JACKSON, 1956).

O sistema Hms não é necessário para adesão ou invasão da *Y. pestis* em células eucarióticas. Este sistema está envolvido no bloqueio do proventrículo da pulga infectada e favorece a transmissão da peste para os mamíferos. Células Hms+ colonizam o proventrículo da pulga e são liberadas durante o repasto no hospedeiro, onde a bactéria rapidamente se multiplica estabelecendo a infecção. Mutantes Hms- sobrevivem e multiplicam-se rapidamente na pulga sem causar bloqueio do proventrículo e morte deste vetor (HINNEBUSH,1996).

Loco *ybt*

O loco *ybt* contém vários genes que codificam enzimas necessárias a biossíntese da yersiniabactina ou Ybt (FETHERSTON *et al*., 1999) e do receptor da Ybt e da pesticina (FETHERSTON *et al*., 1996). Este loco está localizado numa região de 23 kb do cromossomo da *Y. pestis* que é considerado uma HPI da *Y. pestis.* A yersiniabactina (Ybt) é um sideróforo (pequenas moléculas não protéicas) produzido pelas três espécies de *Yersinia* patogênicas e algumas cepas de *E. coli* enteropatógenas (PERRY e FETHERSTON, 1997).

Gene *psn*

O *psn* é denominado *fyuA* em *Y. enterocolitica* e codifica uma proteína, Psn, que desempenha dupla função: receptor da pesticina e da yersiniabactina. A proteína Psn da *Y. pestis* apresenta 98% de homologia com a proteína FyuA de *Y. enterocolitica* (RAKIN *et al*., 1996; 1994).

O sistema *hmu*

O sistema *hmu* corresponde a uma região de 8,6 kb do cromossomo da *Y. pestis*, fora do loco *pgm*, essencial para a utilização de heme (HORNUNG *et al*., 1996). Este sistema parece estar presente também nas outras duas espécies enteropatogênicas: *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. O mecanismo de utilização do sistema *hmu* pelas yersínias ainda não está completamente esclarecido.

O Sistema yfe

O loco *yfe* também envolvido na captação do ferro está localizado numa região de 5,6 kb, no cromossomo da *Y. pestis*. Este loco é encontrado tanto em colônias pigmentadas (Pgm+) quanto não pigmentadas (Pgm-) da *Y. pestis*. O loco contém cinco genes organizados em dois *operons* distintos *yfe*A-D e *yfe*E (BEARDEN *et al*., 1998).

Plasmídeos da *Yersinia pestis*

Cepas típicas de *Y. pestis* apresentam três plasmídeos prototípicos: pFra, pYV e pPst. Cepas de alguns focos de peste apresentam plasmídeos crípticos (PERRY e FERTHERSTON, 1997) e a aquisição de plasmídeos de resistência foi relatada (GUIYOULE *et al*., 2001). Um plasmídeo críptico de *Y. pestis*, apresentando um tamanho de 5.9 kb, chamado pYC, foi encontrado em cepas de *Y. pestis* isoladas na província de Yunnan na China. O sequenciamento deste plasmídeo foi realizado e a análise das seqüências identificaram 12 ORFs, das quais três apresentam similaridades com proteínas de função conhecida (DONG *et al*., 2000).

Manipulações no laboratório (repiques sucessivos, incubação ou estocagem em diferentes temperaturas) podem acarretar perda dos plasmídeos de virulência, de regiões do cromossomo ou mutações nos genes de virulência resultando em alterações na virulência das culturas (PERRY e FETHERSTON, 1997).

Plasmídeo pYV ou pCD1

O plasmídeo pYV ou pCD1 é indispensável à virulência da *Y. pestis* e está presente nas outras espécie de *Yersinia* patogênicas: *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica.* O tamanho do pYV é de cerca de 70 kb. Várias seqüências de inserção estão presentes neste plasmídeo, incluindo as IS*100* e IS*285* (HU *et al*., 1998).

No pYV estão presentes vários *operons* que codificam para diversas funções. Este plasmídeo contém uma região de dependência ao cálcio para crescimento a 37ºC. Fora desta região, estão localizados vários genes que codificam para fatores de virulência: uma adesina (YadA); proteínas antifagocíticas (Yops), e um sistema de secreção tipo III que permite a sobrevivência e multiplicação das bactérias nos tecidos linfóides dos hospedeiros (CORNELIS, 2000).

Plasmídeo pPst ou pCP1

O plasmídeo pPst é específico da *Y. pestis* e tem cerca de 9,5 kb, possuindo apenas uma cópia do elemento IS-*100* (HU *et al*., 1998). Estão presentes no pPst: os genes da pesticina (*pst*), da proteína de imunidade a pesticina (*pim*) e o ativador do plasminogênio (*pla*), (SODEINDE e GOUGUEN, 1988; SODEINDE *et al*., 1988). Este plasmídeo tem importância na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro, a partir do sítio da picada da pulga e no bloqueio do trato digestivo das pulgas (HINNEBUSH, 2003).

A pesticina é uma bacteriocina produzida pela *Y. pestis.* Essa bactéria é imune a pesticina, porque produz uma proteína de imunidade (Pim), (HU e BRUBAKER, 1974; BEN-GURION e HERTMAN, 1958).

O gene *pla* localizado neste plasmídeo codifica diferentes proteínas dependendo da temperatura: abaixo de 30ºC se expressa uma coagulase e acima de 30ºC uma fibrinolisina ou ativador do plasminogênio (SODEINDE e GOUGUEN, 1988). As proteínas codificadas pelo

gene *pla* desempenham importantes funções na transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSCH *et al*., 1996).

Plasmídeo pFra ou pMT1

O pFra tem o tamanho de 90-110 kb e possui uma cópia do elemento de inserção IS-*200*, duas cópias do IS-*100* e uma cópia do IS-*285* (LINDLER *et al*., 1998). Este plasmídeo codifica uma proteína capsular ou fração F1 que desempenha uma atividade antifagocítica (DU *et al*., 2002) e a toxina murina, Ymt, que parece estar envolvida na transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSCH, 2002). A F1 é imunogênica para o homem e outros mamíferos e é largamente utilizada nos testes de diagnóstico da peste (CHU, 2000). O operon *f1* (responsável pela síntese da proteína F1) é constituído de vários genes envolvidos na estrutura (*caf1*), na montagem (*caf1M*) e na regulação (*caf1R*) desta proteína (KARLYSHEV *et al*., 1992a; KARLYSHEV *et al*., 1992b).

Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular baseia-se na identificação e comparação da estrutura genética dos isolados bacterianos permitindo estabelecer correlação entre os isolados (TENOVER *et al*., 1995).

Vários métodos podem ser usados para tipagem das cepas bacterianas: biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e técnicas moleculares. Atualmente existem numerosos métodos de tipagem molecular com capacidade discriminatória diferente.

Os sistemas de tipagem molecular, na sua maioria, são atualmente baseados na PCR e possibilitam a detecção de rearranjos de algumas regiões do genoma e tem sido empregados com sucesso na identificação e monitoramento dos patógenos.Várias técnicas baseadas na PCR (Multiplex – PCR, Nested-PCR em tubo único, PCR em tempo real) vêm sendo utilizadas com sucesso para diagnóstico da peste diretamente em material biológico (sangue, aspirado de bubão, vísceras de roedores, pulgas), (LOIEZ *et al*, 2003, LEAL e ALMEIDA 1999, LEAL *et al.,* 1996).

Um outro método utilizado na tipagem molecular é o PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado). Este método baseia-se na separação de fragmentos de DNA obtidos por

digestão dos cromossomos com endonucleases de restrição que cortam grandes fragmentos, os quais são analisados através da migração em gel submetido a pulsos em direções alternadas (DEN DUNNEN e VAN OMMEN, 1992).

Seqüências de inserção (IS) são também utilizadas nos estudos de tipagem molecular, pela capacidade de se inserir em múltiplos sítios de uma molécula alvo participando de rearranjos cromossômicos causando inserções, deleções e recombinações (HUANG *et al*., 2002; MOTIN *et al*., 2002).

Outro método utilizado em estudos-epidemiológicos que detecta o polimorfismo genético bacteriano é a ribotipagem, baseado no padrão de restrição dos genes do rRNA. Esta técnica é pouco informativa por apresenta limitações relacionadas ao número de locos ribossomais (GRIMONT e GRIMONT, 1986).

O DNA repetitivo é encontrado em abundância tanto no genoma de células de eucariotos quanto de procariotos (COX e MIRKIN, 1997). Regiões do DNA chamadas de minissatélites foram inicialmente usadas em estudos de "fingerprinting" e na detecção de algumas doenças humanas (JEFFREYS *et al*., 1985). Nos últimos anos, com o sequenciamento do genoma completo de cepas bacterianas a utilização dessas regiões em estudos de tipagem e epidemiologia molecular em bactérias patogênicas tornou-se freqüente (LE FLÈCHE *et al*., 2001; KEIM *et al*., 2000).

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

Os VNTRs variam em tamanho, localização e complexidade, podendo ser classificados como VNTRs homogêneos, heterogêneos ou degenerados (VAN BELKUM *et al*., 1998). Quanto ao tamanho, podem ser classificados como mini ou microssatélites. Os microssatélites correspondem a unidades repetidas que variam de 1 a 5 pares de base. Em bactérias, os microssatélites são também chamados de locos de contingência de seqüências simples (BAYLISS *et al*., 2001). Os minissatélites, por outro lado, correspondem a unidades repetidas de mais de seis pares de base. Esses VNTRs podem ser encontrados em tandem ou dispersos no genoma (JEFFREYS *et al*., 1985). Nas bactérias a quantidade de *repeats* em tandem varia significativamente entre os genomas. As análises das seqüências dos genomas de *Y. pestis* e *Bacillus antracis* revelaram uma densidade média de 30 Mb de *repeats* em tandem considerado

um valor relativamente alto quando comparado aos outros genomas bacterianos (LE FLÈCHE *et al*., 2001).

A primeira seqüência repetitiva dispersa descrita e mais intensamente estudada em bactérias é a sequência REP (*repetitive extragenic palindrome*). Esta sequência foi identificada inicialmente em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. A seqüência REP localiza-se freqüentemente na região intergênica de operons análogos em diferentes espécies bacterianas podendo participar de rearranjos ocorridos no genoma (HIGGINS *et al*., 1988). Outra seqüência de DNA repetitivo dispersa conhecida como ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), foi identificada no genoma de cepas de *E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae. Essa sequência tem aproximadamente 126 pb de comprimento e sua localização no genoma bacteriano difere entre as espécies (HULTON *et al*., 1991).

Dependendo da localização destes VNTRs no genoma da bactéria podem ocorrer alterações modificando a expressão gênica e conseqüentemente alterando a seqüência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica interferindo, portanto, na patogenicidade da bactéria e na adaptação do patógeno ao hospedeiro (ADAIR *et al*., 2000).

Em *Y. pestis* várias mutações nos *repeats* associados à perda de funções já foram caracterizadas. A deleção espontânea do gene *psn*, o receptor da pesticina e do sideróforo das yersínias (yersiniabactina) é devido a uma deleção de cinco pb deste gene (LUCIER *et al*., 1996). A *Y. pestis* é naturalmente uréia negativa devido a uma mutação silenciosa, pela adição de uma base nitrogenada G (guanina) em um VNTR monomérico (poli G) pertencente ao gene *ureD* (SEBBANE *et al*., 2001). Estas observações demonstram que os VNTRs podem gerar diversidade genética nos genes que codificam proteínas de interesse para a patogenicidade da *Y. pestis* num curto período de tempo evolutivo. Em *Haemophilus influenzae*, a variação no número de *repeats* tem uma importante função na patogenicidade e na adaptação desse patógeno ao hospedeiro (DE BOLLE *et al*., 2000).

Estudos dos VNTRs são realizados pela análise do MLVA através da PCR. O MLVA-PCR baseia-se na identificação do polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados, como resultados dos eventos de inserção e deleção dentro do VNTR (BENITO *et al*., 2004; POURCEL *et al*., 2004; LE FLÈCHE *et al*., 2001). Esta técnica é utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos especialmente por identificar polimorfismo no genoma de espécies bacterianas que são geneticamente homogêneas quando analisadas por outras técnicas moleculares (VAN BELKUM, 1999).

Estudos dos VNTRs foram realizados em várias espécies bacterianas: *Leptospira interrogans* (SLACK *et al*., 2005), *Enterococcus faecalis* (TITZE-DE-ALMEIDA, 2004; TOP *et al*., 2004), *Y. enterocolitica* (BENITO *et al*., 2004); *Bordetella pertussis* (SCHOULS *et al*., 2004), *Salmonella enterica* (RAMISSE *et al*., 2004, LIU *et al*., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (ONTENIENTE *et al*., 2003), *Mycobacterium bovis* (RORING *et al*., 2002), *Bacillus anthracis* (KEIM *et al*., 2000); *Francisella tularensis* (JOHANSSON *et al*., 2004, FARLOW *et al*., 2001) e *H. influenzae* (VAN BELKUM *et al*., 1997). Em *Y. pestis*, o estudo da variação no número de *repeats* de alguns locos VNTRs auxiliou nos estudos de tipagem (KLEVYTSKA *et al*., 2001, ADAIR *et al*., 2000) e epidemiologia molecular dessa espécie permitindo identificar os clones de *Y. pestis* circulantes em uma determinada área geográfica (LOWELL *et al*., 2005; GIRARD *et al*., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M., ZURTH, K., MORELLI, G., TORREA, G., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v. 96, p. 14043-14048, 1999.

ACHTMAN, M. Population structure of pathogenic bacteria revisited. **International Journal of Medical Microbiology,** v. 294, p. 67-73, 2004.

ADAIR, D.M., WORSHAM, P.L., HILL, K.K., KLEVYTSKA, A.M., JACKSON, P.J., FRIEDLANDER, A.M., KEIM, P. Diversity in a Variable-Number Tadem Repeat from *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology,** v.38, p.1516-1519, 2000.

ALMEIDA, A.M.P., TAVARES, C., LEAL-BALBINO, T.C. Peste. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, v. 2, cap. 126, p. 1509-1522, 2005.

ANISIMOV, A.P., LINDLER, L.E., PIER, G.B. Intraespecific diversity of *Yersinia pestis*. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 17, p. 434-464, 2004.

BAGG A, NEILANDS J.B. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport in *Escherichia coli.* **Biochemistry,** v.26: p. 5471-5477, 1987.

BAYLISS, C.D., FIELD, D., MOXON, E.R. The simple sequence contingency loci of Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. **Jornal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 657-62, 2001

BEARDEN, S.W., STAGGS, T.M., PERRY, R.D. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. **Jounal of Bacteriology,** v.180, p. 1135-1147, 1998.

BEN-GURION, R., HERTMAN, I. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. **Jornal of Genetic Microbiology,** v. 19, p. 289-297, 1958.

BENITO, I., CANO, M.E., AGÜERO, J.L. A polymorphic tandem repeat potentially useful for typing in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Microbiology,** v. 150, p. 199-204, 2004.

BURROWS, TW., JACKSON, S. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 37, p. 577-583, 1956.

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

CHU, M. Laboratory Manual of Plague Diagnosis Tests. CDC/WHO. **Geneve**, p. 129, 2000.

CORNELIS, G.R. Molecular and cell biology aspects of plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 16, p. 8778-8783, 2000.

COX, R., MIRKIN, S.M. Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v. 94, p. 5237-5242, 1997.

DE BOLLE, X., BAYLISS, C.D., FIELD, D., VAN DE VEN, T., SAUNDERS, N.J., HOOD, D.W., MOXON, E.R. The length of a tetranucleotide repeat tract in Haemophilus influenzae determines the phase variation rate of a gene with homology to type III DNA methyltransferases. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 211-222, 2000.

DEN DUNNEN, J.T., VAN OMMEN, G.J.B. Methods for Puseld-Field Gel Electrophoresis. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 38, p. 161-177, 1992.

DENG, W., BURLAND, V., PLUNKETT, 3R.D.G., BOUTIN, A., MAYHEW, G.F., LISS, P., PERNA, N.T., ROSEDJ, M.A.U.B, ZHOU, S., SCHWARTZ, D.C., FETHERSTON, J.D., LINDLER, L.E., BRUBAKER, R.R., PLANOGV, STRALEY, S.C., MCDONOUGH, K.A., NILLES, M.L., MATSON, J.S., BLATTNER, F.R., PERRY, R.D. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **Journal of Bacteriology,** v.184, p. 4601-11, 2002.

DEVIGNAT, R. Variétés de l´espèce *Pasteurella pestis.* Nouvelle hipothèse. **Bulletin de l'organazition Mondial de la Santé.** 4: 247-263, 1951.

DONG, X.Q., LINDLER, L.E., CHU, M.C. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*. **Plasmid,** v. 43, p. 144-148, 2000.

DU, Y., ROSQVIST, R., FORSBERG, A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection Immunology,** v. 70, p. 1453-1460, 2002.

FARLOW, J., SMITH, K.L., WONG, J., ABRAMS, M., LYTLE, M., KEIM, P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeats analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3186-3192, 2001.

FETHERSTON, J.D., BERTOLINO, V.J., PERRY, R.D. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis.* **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 289-299, 1999.

FETHERSTON, J.D., BEARDEN, S.W., PERRY, R.D. YbtA an Arac-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. **Molecular Microbiology**, v. 22, p. 315-325, 1996.

FETHERSTON, J.D., SCHUETZE, P., PERRY, R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 2693-2704, 1992.

FUNASA. Peste in: **Guia de Vigilância Epidemiológica**, v. 5, p. 641-652, 2002a.

FUNASA. **Manual de Controle de Roedores**, p. 22-42, 2002b.

GAGE, K.L., KOSOY, M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 505-28, 2005.

GALIMAND, M., GUIYOULE, A., GERBAUD, G., RASOAMANANA, B., CHANTEAU, S., CARNIEL, E., COURVALIN, P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable *plasmid.* **New England Journal of Medicine,** v. 4, p. 677-680, 1997.

GIRARD, J.M., WAGNER, D.W., VOGLER, A.J., KEYS, C., ALLENDER, C.J., DRICKAMER, L.C. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v. 101, p. 8408-8413, 2004.

GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D. Ribossomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales do Institut Pasteur/Microbiologic**, v. 137, p. 165-175, 1986.

GUIYOULE, A., GERBAUD, G., BUCHRIESER, C., GALIMAND, M., RAHALISON, L., CHANTEAU, S., COURVALIN, P., CARNIEL, E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. **Emerging Infection Disease**, v. 7, p. 43-48, 2001.

HACKER, J., BLUM-OEHLER, G., MUHLDORFER, I., TSHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbiol evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

HIGGINS, C.F., MCLAREN, R.S., NEWBURY, S.F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? **Gene**, v. 72: p. 3-14, 1988.

HINNEBUSH, B.J., PERRY, R.D., SCHWAN, T.G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. **Science**, v. 273, p. 367-370, 1996.

HINNEBUSCH, B.J. Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flear vector of plague. **Advances of Experimental Medicine and Biology,** v. 529p. 55-62, 2003.

HINNEBUSH, B.J., RUDOLPH, A.E., CHEREPANOV, P., DIXON, J.E., SCHWAN, T.G., FORSBERG, A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, v. 296, p. 733-5, 2002.

HORNUNG, J.M., HEATHER, A.J., PERRY, R.D. The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem-protein complexes as iron sources. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 725-739, 1996.

HU, P., ELLIOT, J., CREADY, M.C., SKOWRONSKI; E., GARNES; J., KOBAYASHI; A., BRUBAKER; R.R., GARCIA; E. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. **Jounal of Bacteriology**, v. 180, p. 5192-5202, 1998.

HU, P., BRUBACKER, R.R. Characterization of pesticin. Separation of antibacterial activies. **Jounal Biology Chemmistry**, v. 249, p. 4749-4753, 1974.

HUANG, X.Z., LINDLER, L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocyti factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* Outer Proteins and capsule antigen. **Infection Immunity**, v. 72, p. 7212-7219, 2004.

HUANG, X.Z., CHU, M.C., ENGELTHALER, D.M., LINDLER, L.E. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. **Jounal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1164-73, 2002.

HULTON, C.S., HIGGINS, C.F., SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-834, 1991.

INGLESBY, T.V., DENNIS, D.T., HENDERSON, D.A., BARTLETT, J.G., ASCHER, M.S., EITZEN, E., FINE, A.D., FRIEDLANDER, A.M., HAUER, J., KOERNER, J.F., LAYTON, M., MCDADE, J., OSTERHOLM, M.T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T.M., RUSSEL, P.K., SCHOCH-SPANA, M., TONAT, K. Plague as a Biological Weapon. **Medical and Public Health Management**, v. 283, p. 2281-2290, 2000.

ITEMAN, I., GUIYOULE, A., ALMEIDA, A.M.P. Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated *irp2* gene in *Yersinia pestis:* evidence for separate but related events. **Infection Immunity**, v. 61, p. 717-2722, 1993.

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

JOHANSSON, A., FARLOW, J., LARSSON, P., DUKERICH, M., CHAMBERS, E., BYSTROM, M., FOX, J., CHU, M., FORSMAN, M., SJOSTEDT, A., KEIM, P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeats analysis. **Jounal of Bacteriology**, v. 186, p. 5808-5818, 2004.

KARIMI, Y. Diagnostic rapid de I'infection pesteuse au laboratoire. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales,** 71: 45-48, 1978.

KARLYSHEV, A.V., GALYOV, E.E., ABRAMOV, V.M., ZAV'YALOV, V.P. Caf1R gene and its role in the regulation of capsule formarion of *Yersinia pestis*. **FEBS Letters**, v. 305, p. 37-40, 1992a.

KARLYSHEV, A.V., GALYOV, E.E., SMIRNOV, O.Y., GUZAYEV, A.P., ABRAMOV, V.M., ZAV'YALOV, V.P. A new gene of the *f1* operon of *Yersinia pestis* involved in the capsule biogenesis. **FEBS Letters,** v. 297:77-80, 1992b.

KEIM, P., PRICE, L.B., KLEVYTSKA, A.M., SMITH, K.L., SCHUPP, J.M., OKINAKA, R., JACKSON, P.J., HUGH-JONES, M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2928-36, 2000.

KLEVYTSKA, A.M., PRICE, L.B., SCHUPP, J.M., WORSHAM, L.P., WONG, J., KEIM, P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3179-3185, 2001.

LEAL, N.C., ALMEIDA, A.M.P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 339-342, 1999.

LEAL, N.C., ABATH, F.G.C., ALVES, L.C., ALMEIDA, A.M.P. A simple PCR based procedure for plague diagnosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 38: p. 371-375, 1996.

LE FLÈCHE, P., HAUCK, Y., ONTENIENTE, L., PRIEUR, A., DENOEUD, F., RAMISSE, V., SYLVESTRE, P., BENSON, G., RAMISSE, F., VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. **Microbiology**, v. 1, p. 2, 2001.

LINDLER, L.U., PLANO, G.V., BURLAND, V., MAYHEW, G., BLATTNER, F.R. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen**. Infection and immunity**, v. 66, p. 5731-5742, 1998.

LIU, Y., LEE, M.A., OOI, E.E., MAVIS, Y., TAN, A.L., QUEK, H.H. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4388-4394, 2003.

LOIEZ, C., HERWEGH, S., WALLET, F., ARMAND, S., GUINET, F., COURCOL, R.J. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4873-4875, 2003.

LOWELL, J.L., WAGNER, D.M., ATSHABAR, B., ANTOLIN, M.F., VOGLER, A.J., KEIM, P., CHU, M.C., GAGE, K.L. Identifying sources of human exposure to plague. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 650-656, 2005.

LUCIER, T.S., FETHERSTON, J.D., BRUBAKER, R.R., PERRY, R.D. Iron Uptake and Iron-Repressible Polypeptides in *Yersinia pestis.* **Infection Immunity**, v. 64, p. 3023-3031, 1996.

LUCIER, T.S., BRUBAKER, R.R. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphismo, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed field gel electrophoresis. **Jounal of Bacteriology**, v. 174, p. 2078-2086, 1992.

MOLLARET, H.H. Le cas de la peste. **Annales de démographie historique**, p. 101-110, 1989.

MOTIN, V.L., GEORGESCU, A.M., ELLIOTT, J.M., HU, P., WORSHAM, P.L., OTT, L.L., SLEZAK, T.R., SOKHANSANJ, B.A., REGALA, W.M., BRUBAKER, R.R., GARCIA, E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1019-27, 2002.

ONTENIENTE, L., BRISSE, S., TASSIOS, P.T., VERGNAUD, G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4991-4997, 2003.

PARKHILL, J., WREN, B.W., THOMSON, N.R., TITBALL, R.W., HOLDEN, M.T., PRENTICE, M.B., SEBAIHIA, M., JAMES, K.D., CHURCHER, C., MUNGALL, K.L., BAKER, S., BASHAM, D., BENTLEY, S.D., BROOKS, K., CERDENO-TARRAGA, A.M., CHILLINGWORTH, T., CRONIN, A., DAVIES, R.M., DAVIS, P., DOUGAN, G., FELTWELL, T., HAMLIN, N., HOLROYD, S., JAGELS, K., KARLYSHEV, A.V., LEATHER, S., MOULE, S., OYSTON, P.C., QUAIL, M., RUTHERFORD, K., SIMMONDS, M., SKELTON, J., STEVENS, K., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. **Nature**, v. 413, p. 523-527, 2001.

PENDRAK, M.L., MARTINEZ, R.J. Proteins essential for expression of Hms^+ phenotype of *Yersinia pestis*. **Molecular microbiology**, v.8, p. 857-864, 1993.

PERRY, R.D., FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology**, v. 10, p. 35-66, 1997.

POLLITZER, R. History and present distribution of plague. **In: Plague. W.H.O. Monograph serier**, v. 22, p. 11-45, 1954.

POURCEL, C., ANDRE-MAZEAUD, F., NEUBAUER, H., RAMISSE, F., VERGNAUD, G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **Microbiology**, v. 4, p. 22, 2004.

RAKIN, A., BOOLGAKOWA, E., HEESEMAN, J. Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster. **Microbiology**, v. 142, p. 3415-3424, 1996.

RAKIN, A., SAKEN, E., HARMSEN, D., HEESEMAN, J. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. **Molecular Microbiology**, v. 13 p. 253-263, 1994.

RAMISSE, V., HOUSSU, P., HERNANDEZ, E., DENOEUND, F., HILAIRE, V., LISANTI, O., RAMISSE, F., CAVALLO, J-D., VERGNAUND, G. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5722-5730, 2004.

RORING, S., SCOTT, A., BRITTAIN, D., WALKER, I., HEWINSON, G., NEILL, S., SKUCE, R. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2126-2133, 2002.

SCHOULS, L.M., VAN DER HEIDE, G.J., VAUTERIN, L., VAUTERIN, P., MOOI, F.R. Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5496-5505, 2004.

SEBBANE, F., DEVALCKENAERE, A., FOULON, J., CARNIEL, E., SIMONET, M. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene. **Infection Immunity**, v. 69, p. 170-176, 2001.

SLACK, A.T., DOHNT, M.F., SYMONDS, M.L., SMYTHE, L.D. Developmente of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and

its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from far north Queensland, Australia. **Annals Clinical Microbiology Antimicrobian**, v. 4, p. 10, 2005.

SODEINDE, O.A., GOUGUEN, J.D. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection Immunity**, v. 56, p. 2743-2748, 1988.

SODEINDE, O.A., SAMPLE, A.K., BRUBAKER, R.R., GOGUEN, J.D. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins**. Infection Immunity**, v. 56, p. 2749-52, 1988.

SONG, Y., TONG, Z., WANG, J., WANG, L., GUO, Z., HAN, Y., ZHANG, J., PEI, D., ZHOU, D., QIN, H., PANG, X., HAN, Y., ZHAI, J., LI, M., CUI, B., QI, Z., JIN, L., DAI, R., CHEN, F., LI, S., YE, C., DU, Z., LIN, W., WANG, J., YU, J., YANG, H., WANG, J., HUANG, P., YANG, R. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA Researsh**, v. 11, p. 179-197, 2004.

STAGGS, T.M., PERRY, R.D. Fur regulation in *Yersinia* species. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 2507-2516, 1992.

STRAND, S.T.A., PROLLA, R.M., LISKAY, M. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274-276, 1993.

TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TITZE-DE-ALMEIDA, R., WILLEMS, R.J.L., TOP, J., RODRIGUES, I.P., FERREIRA, R.F., BOELENS, H., BRANDILEONE, M.C.C., ZANELLA, R.C., FELIPE, M.S.S., VAN BELKUM, A. Multilocus variable-number tandem-repeats polymorphism among brazilian *Enterococcus faecalis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4879-4881, 2004.

TOP, J., SCHOULS, L.M., BONTEN, M.J.M., WILLEMS, R.J.L. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4503-4511, 2004.

VAN BELKUM, A., VAN LEEUWEN, W., SCHERER, S., VERBRUGH, H. Occurrence and structure-function relationship of pentameric short sequence repeats in microbial genomes. **Researsh Microbiology,** v. 150, p.617-26, 1999.

VAN BELKUM, A., SCHERER, S., VAN ALPHEN, L., VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 275-93, 1998.

VAN BELKUM, A., SCHERER, S., VAN LEEUWEN, W., WILLEMSE, D., VAN ALPHEN, L., VERBRUGH, H. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection Immunity**, v. 65, p. 5017-5027, 1997.

VIEIRA, J.B.F., COELHO, G.E. Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31 (Supl. II), p. 112-119, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Plague in the Americas. **Scientific Publication**, v. 115, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human plague in 2002 and 2003. **Weekly Epidemiological Research**, v. 79, p. 301-308, 2004.

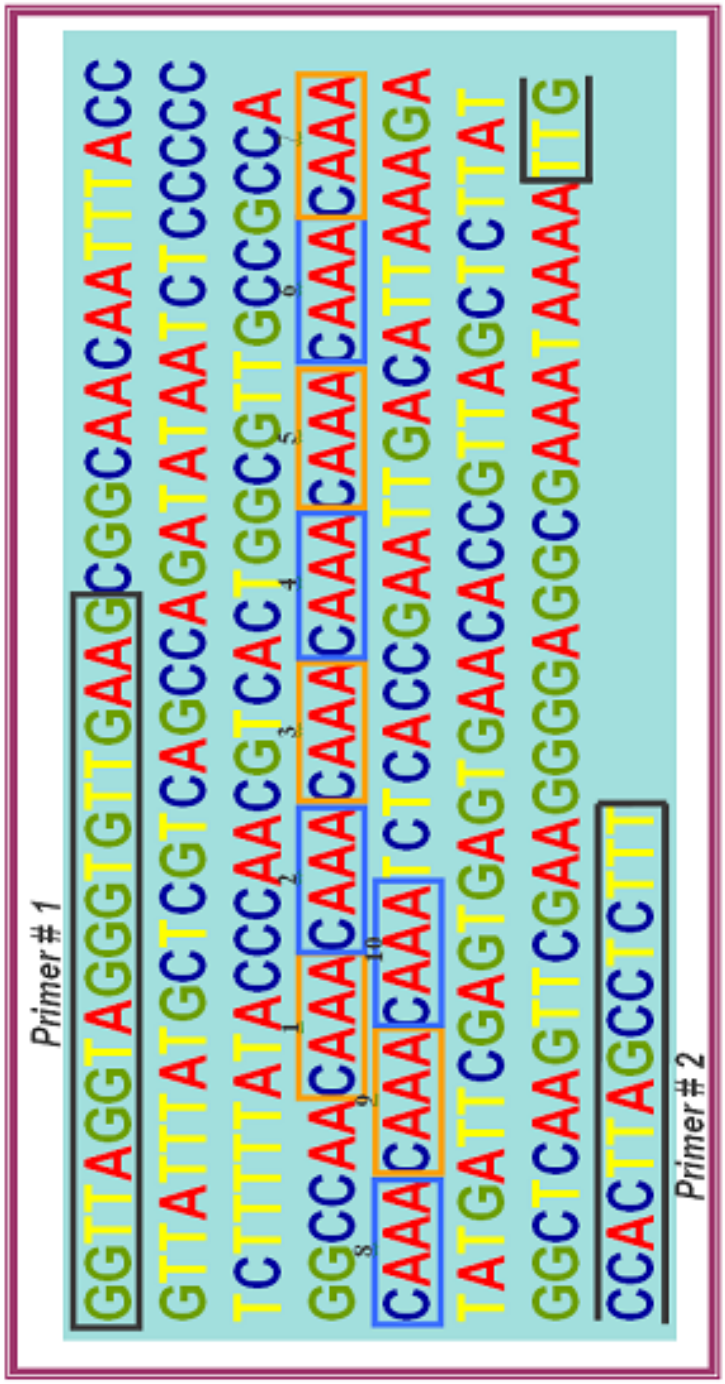


Figura 1 - Esquema representativo de uma seqüência repetitiva em *tandem*

ARTIGOS

ARTIGO I

Tipagem de Cepas Brasileiras de *Yersinia pestis* por MLVA-PCR

MBM Oliveira[1], TC Leal-Balbino[1], MR Araújo[1], TA Campos[1], VQ Balbino[2], FL Almeida[1], NC Leal, AMP Almeida[1].

[1]Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, MS.
[2]Faculdade São Miguel.

E-mail do autor de correspondência: betania@cpqam.fiocruz.br

Palavras chave: Yersínias, polimorfismos, MLVA-PCR.

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

Tipagem de Cepas Brasileiras de *Yersinia pestis* por MLVA-PCR

MBM Oliveira*, TC Leal-Balbino, MR Araújo, TA Campos, VQ Balbino, FL Almeida, NC Leal, AMP Almeida

Resumo

No período de 1966 a 1997 foram isoladas 917 amostras de *Yersinia pestis* (agente causador da peste) de material de origem humana, de roedores e pulgas dos focos pestosos do nordeste do Brasil. A tipagem fenotípica e molecular dessas cepas não detectou modificações associadas a nenhuma característica epidemiológica, origem geográfica ou hospedeiro. A MLVA-PCR (Multiple locus VNTR analysis – PCR) tem sido usada com sucesso em estudos epidemiológicos da *Y. pestis.* No presente trabalho foram analisados seis locos VNTRs em 31 cepas de *Y. pestis* isoladas de humanos, roedores e pulgas em três focos de peste brasileiros além de oito cepas de *Y. pestis* de outros países, nove cepas de *Y. enterocolitica* e cinco de *Y. pseudotuberculosis*, para verificar a existência de variabilidade genética em cepas originadas de diferentes fontes, períodos e regiões geográficas. Pelos padrões obtidos pelo MLVA-PCR os 31 isolados brasileiros de *Y. pestis* foram agrupados em 16 perfis genotípicos. Alguns genótipos apresentaram uma ampla distribuição, enquanto outros foram restritos a um determinado foco. As cepas originadas de humanos foram as que apresentaram a maior variabilidade genética. As cepas estrangeiras foram distribuídas em sete perfis. Entre esses, quatro foram específicos do local de isolamento e três foram comuns às cepas dos focos de peste do nordeste do Brasil. O MLVA-PCR revelou diversidade genética entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* apesar da similaridade genética entre essas duas espécies. Surpreendentemente, embora a *Y. enterocolitica* seja uma espécie muito heterogênea foi encontrado menor polimorfismo nos locos analisados das cepas estudadas do que nas espécies mais homogêneas *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis.*

Palavras-chave: *Yersiniae*, genotipagem, MLVA-PCR

*Endereço para correspondência: Maria Betânia Melo de Oliveira. CPqAM/FIOCRUZ/MS. Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420. Recife, PE, Brasil. Tel: 55 81 21012634 Fax: 55 81 3453 2449; e-mail: betania@cpqam.fiocruz.br

A *Yersinia pestis*, o agente etiológico da peste, é uma bactéria gram negativa da família Enterobacteriaceae. A peste é uma doença primária de roedores, transmitida de um animal ao outro através da picada de pulgas infectadas que também infectam o homem (Perry & Fetherston 1997). A peste foi introduzida no Brasil durante a última pandemia e se fixou nas áreas rurais, principalmente na região nordeste, onde vários focos ainda são ativos (WHO 1965, FUNASA 2002). Os focos estão situados em elevações onde as condições de temperatura e umidade permitem a circulação da bactéria por tempo indeterminado entre seus reservatórios/hospedeiros. Em condições ecológicas especiais ocorrem as expansões, com os limites dos focos sendo ultrapassados graças ao aumento da densidade dos reservatórios, criando-se uma situação de risco para as zonas indenes. Os focos são delimitados pela ocorrência de peste humana ou animal e muitas vezes as áreas de foco ultrapassam os limites geográficos dos municípios ou estados, desconhecidos para os hospedeiros e vetores, de modo que o mesmo foco pode se estender por diversos municípios ou mesmo estados. Alguns focos como os de Triunfo e da Chapada do Araripe têm dimensões reduzidas e são bem limitados geograficamente pela vegetação das áreas circunvizinhas e são considerados focos limitados (Baltazard 1968). Outros são extensos como o foco da Borborema que se estende do Rio Grande do Norte a Alagoas e não tem limites bem determinados e são considerados focos difusos (Baltazard 1968). Diversas espécies de roedores e pulgas participam do ciclo epidemiológico da peste nos focos brasileiros, mas o *Bolomys lasiurus* e suas pulgas *Polygenis* spp tem especial importância (Baltazard 2004).

Durante as atividades de vigilância e controle da peste nos focos do nordeste do Brasil foram isoladas 917 amostras de *Y. pestis* de material de origem humana, de roedores e pulgas no período de 1966 a 1997. A tipagem fenotípica e molecular dessas cepas não detectou modificações associadas a nenhuma característica epidemiológica, origem geográfica ou hospedeiro (Leal et al. 1997, Cavalcanti et al. 2002, Sobreira et al. 2003).

A MLVA-PCR (Multiple locus VNTR analysis – PCR) tem sido usada com sucesso no rastreamento de cepas de surtos em estudos filogenéticos na identificação da heterogeneidade genética em espécies homogêneas como a *Y. pestis* (Klevytska et al. 2001, Le Flèche et al. 2001, Pourcel et al. 2004, Lowell et al. 2005).

Neste trabalho foram analisados seis locos VNTRs (número variável de repeats em tandem) presentes no genoma da *Y. pestis* para verificar a existência de variabilidade genética em cepas brasileiras originadas de diferentes fontes, períodos e regiões geográficas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias e condições de cultivo - O trabalho envolveu um total de 31 cepas de *Y. pestis* isoladas de humanos, roedores e pulgas no período de 1966 a 1982 em três focos de peste brasileiros (Tabela I), (Almeida et al. 1985). Oito cepas de *Y. pestis* de outros países, nove cepas de *Y. enterocolitica* e cinco de *Y. pseudotuberculosis* foram incluídas para comparações (Tabelas II, III, IV).

As cepas mantidas na coleção de culturas do CPqAM foram crescidas em BHI (brain heart infusion, Difco) a 28°C por 24h e em seguida plaqueadas em meio BAB (blood agar base, Difco) incubado a 28°C por 48h (*Y. pestis*) e 24h (*Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*). Colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI para extração do DNA genômico.

As cepas brasileiras de *Y. pestis* são identificadas com a denominação de P (peste), Exu (isoladas no Plano Piloto de Peste em Exu) e número de ordem dos isolamentos. As cepas isoladas em outros laboratórios da rede de laboratórios de peste do Brasil receberam a identificação do Estado de origem (Almeida et al. 1985).

Extração do DNA genômico - Um mililitro da cultura em BHI foi centrifugado a 12.000rpm a 4ºC, o sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 500µl de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado homogeneizado com 500µl de TE, 10µl de lisozima (10mg/ml) e 10µl de proteinase K (5mg/ml). A suspensão foi incubada a 60ºC por 20 minutos seguido da adição de 100µl de STE (SDS 2,5%, Tris-HCl 10mM pH8,0; EDTA 0,25M), 15 minutos de incubação a 60ºC, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130 µl de acetato de amônio 7,5M, mantida no banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos. Aproximadamente 700µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado o mesmo volume de fenolclorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol a -70ºC por 30 minutos ou a –20ºC por 24 horas seguido de centrifugação e

descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 10µl de solução de RNAse (10mg/ml) e conservado a -20ºC. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 0,6% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V e visualização sob luz UV após coloração em solução de brometo de etídio (15 mg/ml). A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *Hind* III.

Amplificação por PCR dos locos VNTRs - Seis locos VNTRs denominados neste trabalho como VNTR1, VNTR2, VNTR3, VNTR4, VNTR5 e VNTR6, foram selecionados entre os descritos na literatura e analisados com os *primers* 1AB descrito por Adair et al. (2000); 2AB, 3AB, 4AB, 5AB e 6AB descritos por Le Flèche et al. (2001). A Tabela V mostra as características dos VNTRs analisados.

Os ensaios de PCR foram realizados em um volume final de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA, 20 pmol de cada *primer*, tampão (pH8) 50 mM, desoxinucleotídeo trifosfato 0,16mM (dNTP-Invitrogen, Brasil), $MgCl_2$ 1,5 mM e 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil).

Para o *primer* 1AB o termociclador (Biometra) foi programado para 94ºC por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 60ºC durante 1 minuto e 72ºC por 1 minuto terminando com uma extensão final de 72ºC por 5 minutos. Para os demais *primers* a programação foi de 96ºC por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 96ºC por 20 segundos a 60ºC por 30 segundos e a 65ºC por 1 minuto, terminando com 65ºC por 5 minutos. As reações de PCR com os diferentes *primers* foram repetidas três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão Tris-Borato sob voltagem de 120V, corados com brometo de etídeo (15 mg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e digitalizados em câmera Kodak®. Foi utilizado como padrão de massa molecular o "50 e o 100 base-pair DNA ladder" (Invitrogen, Brasil).

Análise dos dados - O tamanho dos amplicons foi determinado através do programa 1D Image Analysis software, versão 3.5 da Kodak Digital Science. O número dos *repeats* de cada

amplicon foi calculado usando a fórmula: Número de *repeats* = tamanho do amplicon (pb) – região flanqueadora (pb) / tamanho do *repeat* (pb).

O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi estimado pelo método de Nei & Li (1979), utilizando o programa NTSYSpc v. 2.0 (Exeter Software, Setauket, Estados Unidos) e o agrupamento dos perfis genotípicos foi realizado pelo algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal 1962).

Purificação e Sequenciamento dos segmentos amplificados por PCR - Para confirmar o tamanho e o número dos *repeats* determinados pelo MLVA-PCR, foram selecionados *amplicons* obtidos com os diferentes *primers* utilizados. Os *amplicons* selecionados foram purificados com o kit purelink PCR purification (Invitrogen, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos *primers* usados para as amplificações da PCR, no seqüenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), usando o "*Bigdye Kit*" (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas: BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al. 1997); Seq Tools V. 8.3.022 (http://www.seqtool.dk) e Bio Edit V. 7.0.5.2 (Hall 1999). O número de *repeats* foi determinado pelo progama Tandem repeats finder (Benson 1999).

Foram realizadas análises *in silico* utilizando o programa BLAST para verificar a localização dos VNTRs no genoma completo de cepas de *Y. pestis* previamente seqüenciados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise pelo MLVA-PCR de cepas de *Y. pestis* de três focos de peste do nordeste do Brasil - Houve amplificação de todos os seis locos em todas as amostras analisadas. Para o VNTR1 foram obtidos *amplicons* de tamanho variado de 255 pares de base (pb) com nove *repeats* a 263 pb com 11 *repeats* (Tabela VI, Fig. 1a). Com o loco VNTR2, os segmentos variaram de 245 pb com dois *repeats* a 665 pb com nove *repeats* (Tabela VI, Fig. 1b). Com o VNTR4 houve amplificação de segmentos de tamanho variado de 243 pb com sete *repeats* a 383 pb com 26 *repeats* (Tabela VI, Fig. 1d). Exceto a P. Exu 16, todas as amostras analisadas amplificaram um único segmento de aproximadamente 700 pb com 28 *repeats* com o loco VNTR3. O loco VNTR5 amplificou um segmento de aproximadamente 270 pb com sete *repeats* em todas as amostras (Fig. 1e) e para o loco VNTR6 foi observado um *amplicom* de 690 pb com dois *repeats* em todas as cepas analisadas (Fig. 1f).

A P. Exu 16 revelou um padrão de amplificação particular para os locos VNTR2, VNTR3 e VNTR4, diferente das outras cepas brasileiras: 365 pb com quatro *repeats* para o VNTR2, 550 pb com 23 *repeats* para o VNTR3 e 383 pb com 26 *repeats* para o VNTR4 (Tabela VI). Com o VNTR1 amplificou-se um segmento de 263 pb com 11 *repeats*, com o VNTR5 um segmento de 270 pb com sete *repeats* e com o VNTR6 um segmento de 690 pb com 2 *repeats*.

Baseado nos padrões obtidos pelo MLVA-PCR os 31 isolados de *Y. pestis* de diferentes focos de peste do Nordeste do Brasil foram agrupados em 16 perfis genotípicos denominados P1 a P19, exceto P6, P11 e P12 (Fig. 2) que foram identificados em outros estudos com outros grupos de cepas (a ser publicado em outro artigo). Alguns genótipos apresentaram uma ampla distribuição, enquanto outros foram restritos a um determinado foco (Figura 2). As cepas originadas de humanos foram as que apresentaram a maior variabilidade genética e todos os perfis encontrados nas cepas originadas das pulgas (*Polygenis spp.)* foram também encontrados nas cepas de origem humana, com exceção do perfil P18. Vale salientar que a *Polygenis spp* é o principal vetor da *Y. pestis* entre os roedores nos focos do nordeste do Brasil (Baltazard 2004). A observação dos mesmos perfis nas cepas humanas e de *Polygenis spp.,* comprovam o papel dessa pulga na transmissão da peste para o homem.

A maioria das amostras está distribuída nos perfis P2, P4 e P14 que foram os mais amplamente distribuídos por local, origem e período de isolamento (Figura 2). Os perfis P2 e P14 foram encontrados nos três focos estudados. Alguns perfis foram restritos a um só foco, como: P1, P9, P10 e P19 encontrados apenas em amostras originadas da Chapada do Araripe, P13 do foco de Triunfo e P3, P5, P7, P8 e P18 do Planalto da Borborema (Figura 2, 3). Quanto ao período de isolamento, nos anos 1968, 1975 e 1979 foi observada maior diversidade genotípica das cepas (Tabela I).

O número de acesso ao Genbank para as seqüências dos locos analisados corresponde ao bankit 789548. Os resultados das análises *in silico* revelaram a localização dos VNTRs no cromossomo e no plasmídeo pYV das cepas CO92 e KIM seqüenciados respectivamente por Parkhill et al. 2001 e Deng et al. 2002 (Tabela V).

Análise de cepas de *Y. pestis* de outros focos de peste do mundo - As cepas isoladas de outros focos de peste amplificaram segmentos de 255 a 263 pb com nove a 11 *repeats* para o loco VNTR1; 245 a 665 pb com dois a nove *repeats* para o loco VNTR2; 496 a 700 pb com 20 a

28 *repeats* para o loco VNTR3; 250 pb a 383 pb com sete a 26 *repeats* para o loco VNTR4, 270 pb com sete *repeats* para o loco VNTR5 e 690 pb com dois *repeats* para o loco VNTR6 (Tabela II).

Pelos resultados do MLVA-PCR as cepas estrangeiras foram distribuídas em sete perfis (P1, P2, P4, P20, P21, P22 e P23), (Tabela II). Entre esses perfis, quatro foram específicos do local de isolamento e três foram comuns às cepas dos focos de peste do Nordeste do Brasil.

Estudo pelo MLVA-PCR de cepas de *Y. enterocolitica* - Nas amostras de *Y. enterocolitica* analisadas não houve amplificação com o loco VNTR1. A Figura 4a mostra a amplificação de um segmento de aproximadamente 259 pb com 10 *repeats* na cepa de *Y. pseudotuberculosis*, usada como controle positivo e nenhuma amplificação nas cepas de *Y. enterocolitica* nos ensaios com o loco VNTR1. Com o VNTR2 houve amplificação de um segmento de 605 pb em três amostras e 665 pb em cinco (Tabela III, Fig. 4b). Todas as amostras amplificaram um segmento de 700 pb com o loco VNTR3, 250 pb com o VNTR4, 270 pb com o VNTR5 e 690 pb com o VNTR6 (Tabela III, Fig. 4c-f).

Apesar da *Y. enterocolitica* ser uma espécie muito heterogênea possuindo vários biotipos, fagotipos e numerosos sorotipos (Bottone 1997) surpreendentemente foi encontrado menor polimorfismo nos locos analisados das cepas estudadas do que nas espécies mais homogêneas *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis.* A falta de amplificação do VNTR1 pode sugerir maior diversidade genética na região que flanqueia esse loco em relação a *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* ou a ausência completa deste loco no genoma de *Y. enterocolitica*.

Estudo pelo MLVA-PCR de cepas de *Y. pseudotuberculosis* - Todos os locos VNTRs, foram amplificados nas cepas de *Y. pseudotuberculosis*. Com os locos VNTR1 e VNTR3 os tamanhos dos fragmentos amplificados foram idênticos aos encontrados em cepas de *Y. pestis*. Os demais locos apresentaram um elevado polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados. Enquanto em *Y. pestis* e *Y. enterocolitica* os locos VNTR5 e VNTR6 foram monomórficos nas cepas de *Y. pseudotuberculosis* estudadas estes locos foram os mais polimórficos (Tabela IV).

Com o loco VNTR1 o tamanho do fragmento amplificado variou de 255 pb a 263 pb em todas as cepas (Tabela I, Fig. 5a). Para o loco VNTR2 cada cepa de *Y. pseudotuberculosis* amplificou um segmento de tamanho diferente variando de 305 a 1090 pb (Tabela IV, Fig. 5b).

Com o VNTR3 todas as amostras amplificaram um segmento de 700 pb (Tabela IV, Fig. 5c). Para o loco VNTR4 houve amplificação de segmentos de 229 a 257 pb (Tabela IV, Fig. 5d). Com o loco VNTR5 foram amplificados segmentos de 220 a 295 pb (Tabela IV, Fig. 5e) e para o loco VNTR6 houve amplificação de fragmentos de 450 a 1000 pb (Tabela IV, Fig. 5f).

Embora, *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* sejam geneticamente relacionadas, apresentando mais de 90% de similaridade genética (Achtman et al. 1999) e não tendo sido encontradas diferenças entre essas espécies com outros métodos de tipagem (Sobreira 2003) o MLVA-PCR revelou diversidade genética nessas duas espécies.

REFERÊNCIAS

Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E 1999.*Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A. 96*: 14043 - 14048.

Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P 2000. Diversity in a Variable-Number Tadem Repeat from *Yersinia pestis*. J *Clin Microbiol 38*: 1516-1519.

Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR 1985. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Rev Inst Med trop São Paulo 27*: 207-218.

Altschul SF, Maden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res 25*: 3389-3402.

Baltazard M. 4e rapport (mai1970) 2004. Progress report. Recherches sur la peste au Brésil. *Bull Soc Pathol Exot 97*suppl: 93-117.

Baltazard M 1968. Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Rev Bras Malariol D Trop 20*: 335-366.

Benson G 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res 5*: 573-580.

Bottone EJ 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Clin Microbiol Rev 10*: 257-276.

Cavalcanti YVN, Leal NC, Almeida, AMP 2002. Typing of *Yersinia* pestis isolates from the State of Ceará, Brazil. *Letters in Applied Microbiol 35*: 543-547.

Deng W, Burland V, Plunkett RDG, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, Perna NT, Rosedj MAUB, Zhou S, Schwartz DC, Fetherston JD, Lindler LE, Brubaker RR, Planogv Straley SC, Mcdonough KA, Nilles ML, Matson JS, Blattner FR, Perry RD 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol 184* : 4601-4611.

Funasa 2002. Peste, *in*: *Guia de Vigilância Epidemiológica* 5ª ed. *II*: 641-652.

Hall TA 1999. ioEdit a user-friendly biological sequence aligment editor and analysis program for windows. *Nucl Acids SympSer 41*: 95-98.

Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham LP, Wong J, Keim P 2001. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* Genome. *J Clin Microb 39*: 3179-3185.

Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G 2001. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. *BMC Microbiol* 1:2.

Leal NC, Farias RCL, Silva MSB, Leal TCA, Almeida AMP, Ferreira LCS 1997 Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in northeast Brazil. *Rev Microbiol São Paulo 28*: 40-45

Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu M, Gage KL 2005. Identifying sources of human exposure to plague. *J Clin Microbiol 43*: 650-656.

Maniatis T, Frisch E, Sambrook J 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, NY.*

Nei M, Li W-H 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci 76*: 5267-5273.

Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebaihia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeno-tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature 413*: 523-527.

Perry RD, Fetherston JD 1997. *Yersinia pestis* – Etiologic Agent of Plague. *Clin Microbiol Rev 10*: 35-66.

Pourcel C, Andre-mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *Microbiology 4*: 22-28.

Silva ACM 2004. *Tipagem de cepas de Yersinia pestis dos focus do estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS 100*. Dissertação de Mestrado, UFPE.

Sneath PHA, Sokal RR 1962. Numerical Taxonomy. *Nature 3*: 855-860.

Sobreira M 2003. Analisys of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of diferent bacteria. *Rev Inst Med Trop São Paulo 45*: 68-68.

World Health Organization. Plague in the Americas

Tabela I - Características gerais de cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes focos de peste no Brasil

Cepas	Ano	Origem				Perfil Genotípico
		Fonte	Foco	Município - Estado	Sítio	
P. Exu 15	1966	Humano	Araripe	Exu - PE	Retiro	P4
P. Exu 16	1966	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Minador	P10
P. Exu 17	1966	Humano	Triunfo	Triunfo - PE	Santa Clara	P2
P. Exu 185	1967	Humano	Borborema	Caruaru - PE	Lagoa do Anjo	P11
P. Exu 246	1968	Humano	Araripe	Araripina - PE	Cascavel	P4
P. Exu 248	1968	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Baixa Verde	P12
P. Exu 249	1968	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Bananeira	P13
P. Exu 276	1968	Humano	Araripe	Bodocó PE	Queimada	P9
P. Exu 292	1968	Humano	Triunfo	São José do Belmonte-PE	Mata Redonda	P14
P. Exu 312	1969	Humano	Araripe	Exu - PE	Badreci	P11
P. Exu 334	1969	Humano	Araripe	Exu - PE	Gambá	P8
P. Exu 340	1969	Humano	Araripe	Ipubi - PE	Serra Antônio Barbosa	P16
P. Exu 351	1969	Humano	Triunfo	Triunfo - PE	Batinga	P11
P. Exu 384	1970	PJ	Araripe	Exu - PE	Oriente	P14
P. Exu 674	1974	Humano	Araripe	Exu - PE	Brejo de Santo Inácio	P2
P. Exu 738	1975	Humano	Araripe	Araripina - PE	Cansanção	P1
P. Exu 769	1975	Humano	Araripe	Ipubi - PE	Cacimbinha	P1
P. Exu 771	1975	Humano	Araripe	Araripina - PE	Serra Antônio Domingo	P4
P. Exu 778	1975	Humano	Araripe	Araripina - PE	Cavaco	P2
P. Exu 781	1975	Humano	Araripe	Granito - PE	Catumbi	P1
P. Exu 788	1977	PJ	Araripe	Araripina - PE	Alto Alegre	P11
P. Exu 825	1979	PJ	Borborema	Tacaimbó - PE	Malhada do Juá	P2
P. Exu 827	1979	PJ	Borborema	São Caetano- PE	Campo Alegre	P15
P. Exu 832	1979	PJ	Borborema	Tacaimbó - PE	Paulista	P15
P. Exu 841	1979	Humano	Triunfo	Manaíra - PB	Fazenda	P11
P.PB 811	1979	BL	Borborema	Natuba - PB	Estivas	P5
P. PB 817	1979	OS	Borborema	Natuba - PB	Estivas	P3
P. PB 820	1979	BL	Borborema	Natuba - PB	Tauá	P6
P. PB 843	1980	BL	Borborema	Natuba - PB	Salgadinho	P7
P PB 851	1980	BL	Borborema	Natuba - PB	Gitó	P7
P. PB 860	1982	BL	Borborema	Salgado São Félix - PB	Engenho Covão	P4

PJ: *Polygenis jordani* , BL: *Bolomys lasiurus* , OS: *Orysomys subflavus*

Tabela II - Perfil genotípico em cepas de *Y. pestis* isoladas de outros focos de peste no mundo

Cepa	**Foco**	**Tamanho do amplicon/ nº de *repeats***				**Perfil Genotípico**
		VNTR1	**VNTR2**	**VNTR3**	**VNTR4**	
PKOL	Curdistão	263/11	605/8	700/28	250/7	P1
PBM5	Birmania	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
P. Peru 375	Peru	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
EV 76	Madagascar	255/9	605/8	700/28	250/7	P4
PKR 684	Irã	263/11	365/4	496/20	327/18	P20
KIM	Irã	259/10	365/4	496/20	383/26	P21
PB8	Birmania	263/11	245/2	700/28	271/10	P22
Alexander	EUA	259/10	665/9	700/28	271/10	P23

Tabela III - Perfil genotípico das cepas de *Yersinia enterocolitica*

Cepa	Fonte	Sorotipo	Tamanho do amplicon (pb)					
			VNTR1	VNTR2	VNTR3	VNTR4	VNTR5	VNTR6
Ye 5a	Suíno	0:3	–	665	700	250	270	690
Ye 25L	Suíno	0:3	–	665	700	250	270	690
Ye 25C	Suíno	0:3	–	605	700	250	270	690
Ye 37	Suíno	0:3	–	*	700	250	270	690
Ye 40	Suíno	0:3	–	605	700	250	270	690
Ye 41	Suíno	0:3	–	665	700	250	270	690
Ye 43p	Humano	0:6	–	665	700	250	270	690
Ye 102p	Humano	0:5	–	665	700	250	270	690
Ye 124p	Humano	0:4	–	605	700	250	270	690

– não houve amplificação; * não realizado

Tabela IV - Perfil genotípico das cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*

Cepa	Fonte	Sorotipo	Tamanho do amplicon (pb)					
			VNTR1	VNTR2	VNTR3	VNTR4	VNTR5	VNTR6
IP 32944	Bovino	III	263	305	700	250	220	450
IP 32950	Humano	I	259	550	700	229	270	900
IP 32952	Humano	IV	255	910	700	257	245	*
IP 32953	Humano	I	255	1090	700	250	270	800
IP 31553	Roedor	VI	259	605	700	257	295	1000

* não realizado

Tabela V - Características dos VNTRs analisados em cepas de *Y. pestis* do NE do Brasil

Loco	**Seqüência do *primer***	**Localização no genoma***	**Tamanho do *repeat* (pb)**	**Número de alelos em *Y. pestis***
VNTR1	FP: GGTTAGGTAGGGTGTTGAAG RP: AAAGAGGCTAAGTGGCAA	Cromossomo	4	3
VNTR2	FP: AATTTTGCTCCCCAAATAGCA RP:TTTTCCCCATTAGCGAAATAAGTA	Cromossomo	60	5
VNTR3	FP: CGTTACCCTTGTTGCCAATAGT RP: ACGCAGAACATGCTTACCTTTTAT	Plasmídeo (pYV)	18	2
VNTR4	FP: CAGGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG RP:CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA	Cromossomo	7	4
VNTR5	FP: GTCCACCATTTTCATACTGTCACTT RP: GCTCTTTGTCGATTTTATTGAATG	Cromossomo	25	1
VNTR6	FP: CAATAATACCATCGTGCGTGATAC RP: TATTAATGGTGGTGTTAGTCGCTGT	Cromossomo	216	1

Tabela VI - Perfil genotípico das cepas de *Y. pestis* isoladas de diferentes focos de peste

Cepas	Tamanho do amplicon/ nº de repeat				Perfil Genotípico
	VNTR1	VNTR2	VNTR3	VNTR4	
P. Exu 15	255/9	605/8	700/28	250/7	P4
P. Exu 16	263/11	365/4	550/23	383/26	P13
P. Exu 17	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
P. Exu 185	259/10	605/8	700/28	271/10	P14
P. Exu 246	255/9	605/8	700/28	250/7	P4
P. Exu 248	263/11	245/2	700/28	250/7	P15
P. Exu 249	255/9	245/2	700/28	271/10	P16
P. Exu 276	255/9	665/9	700/28	250/7	P10
P. Exu 292	263/11	605/8	700/28	271/10	P17
P. Exu 312	259/10	605/8	700/28	271/10	P14
P. Exu 334	259/10	665/9	700/28	250/7	P9
P. Exu 340	259/10	545/7	700/28	250/7	P19
P. Exu 351	259/10	605/8	700/28	271/10	P14
P. Exu 384	263/11	605/8	700/28	271/10	P17
P. Exu 674	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
P. Exu 738	263/11	605/8	700/28	250/7	P1
P. Exu 769	263/11	605/8	700/28	250/7	P1
P. Exu 771	255/9	605/8	700/28	250/7	P4
P. Exu 778	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
P. Exu 781	263/11	605/8	700/28	250/7	P1
P. Exu 788	259/10	605/8	700/28	271/10	P14
P. Exu 825	259/10	605/8	700/28	250/7	P2
P. Exu 827	259/10	245/2	700/28	271/10	P18

P. Exu 827	259/10	245/2	700/28	271/10	P18
P. Exu 832	259/10	245/2	700/28	271/10	P18
P. Exu 841	259/10	605/8	700/28	271/10	P14
P.PB 811	255/9	605/8	700/28	271/10	P5
P. PB 817	259/10	665/9	700/28	243/6	P3
P. PB 820	263/11	665/9	700/28	243/6	P7
P. PB 843	263/11	605/8	700/28	243/6	P8
P PB 851	263/11	605/8	700/28	243/6	P8
P. PB 860	255/9	605/8	700/28	250/7	P4

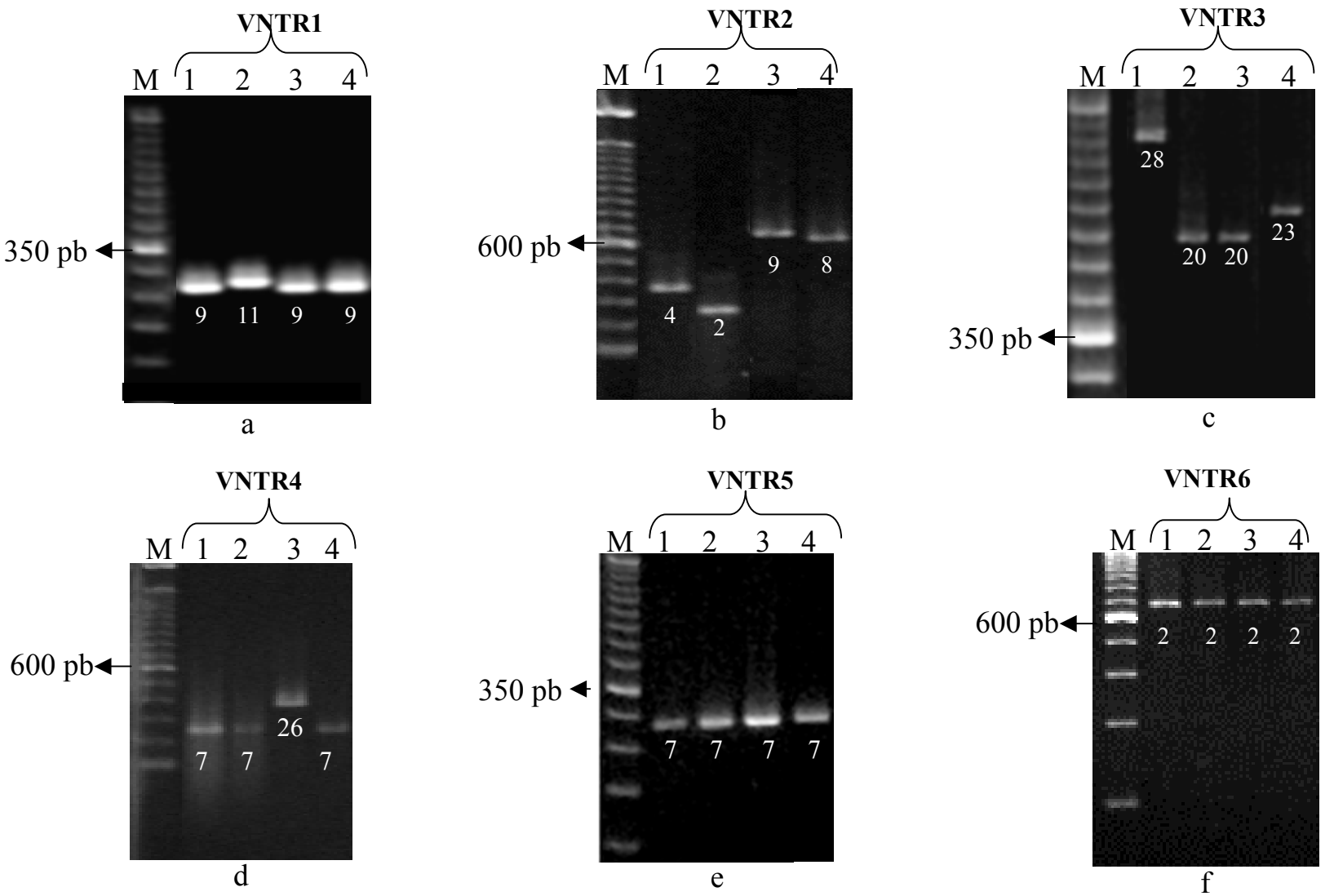


Fig. 1: Gel de agarose 2,5% representativo das cepas de *Y. pestis*. (a) Linhas – 1: P. Exu 276, 2: P. Exu 769, 3: P. Exu 15, 4: P. Exu 771; (b)Linhas – 1: P. Exu 16, 2: P. Exu 249, 3: P. Exu 276, 4: P. Exu 312; (c) Linhas – 1: P. Exu 769, 2: PKR 684, 3: KIM, 4: P. Exu 16; (d) Linhas – 1: P. Exu 738, 2: P. Exu 15, 3: P. Exu 16, 4: P. Exu 771; (e) Linhas – 1: P. Exu 778, 2: P. Exu 334, 3: EV 76, 4: P. Exu 246; (f) Linhas – 1: P. Exu 778, 2: P. Exu 334, 3: PKR 684, 4: P. Exu 312. M. "50 e

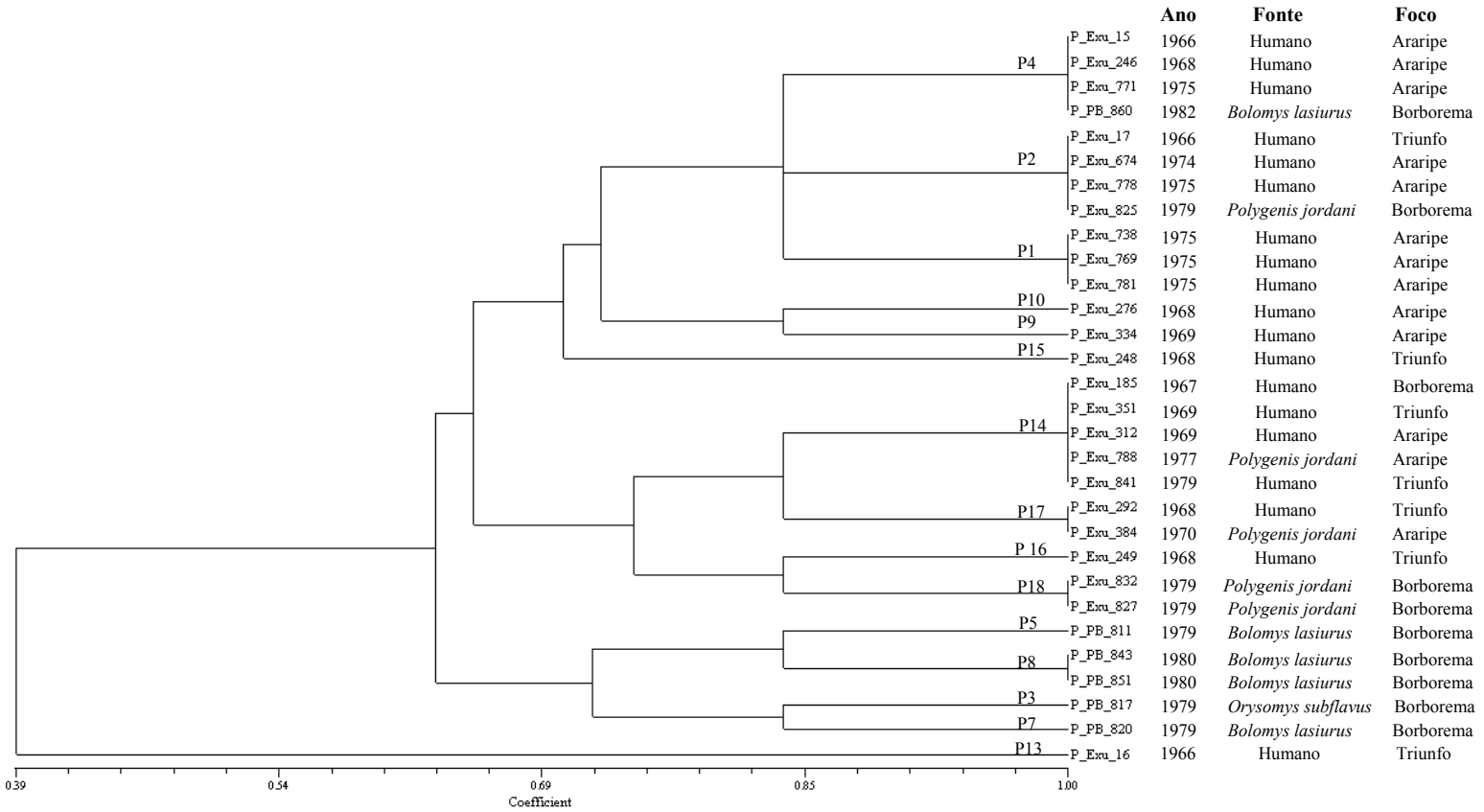


Fig. 2: Dendrograma construído baseado na análise das 31 cepas de *Y. pestis* isoladas de três focos de peste do Nordeste do Brasil.

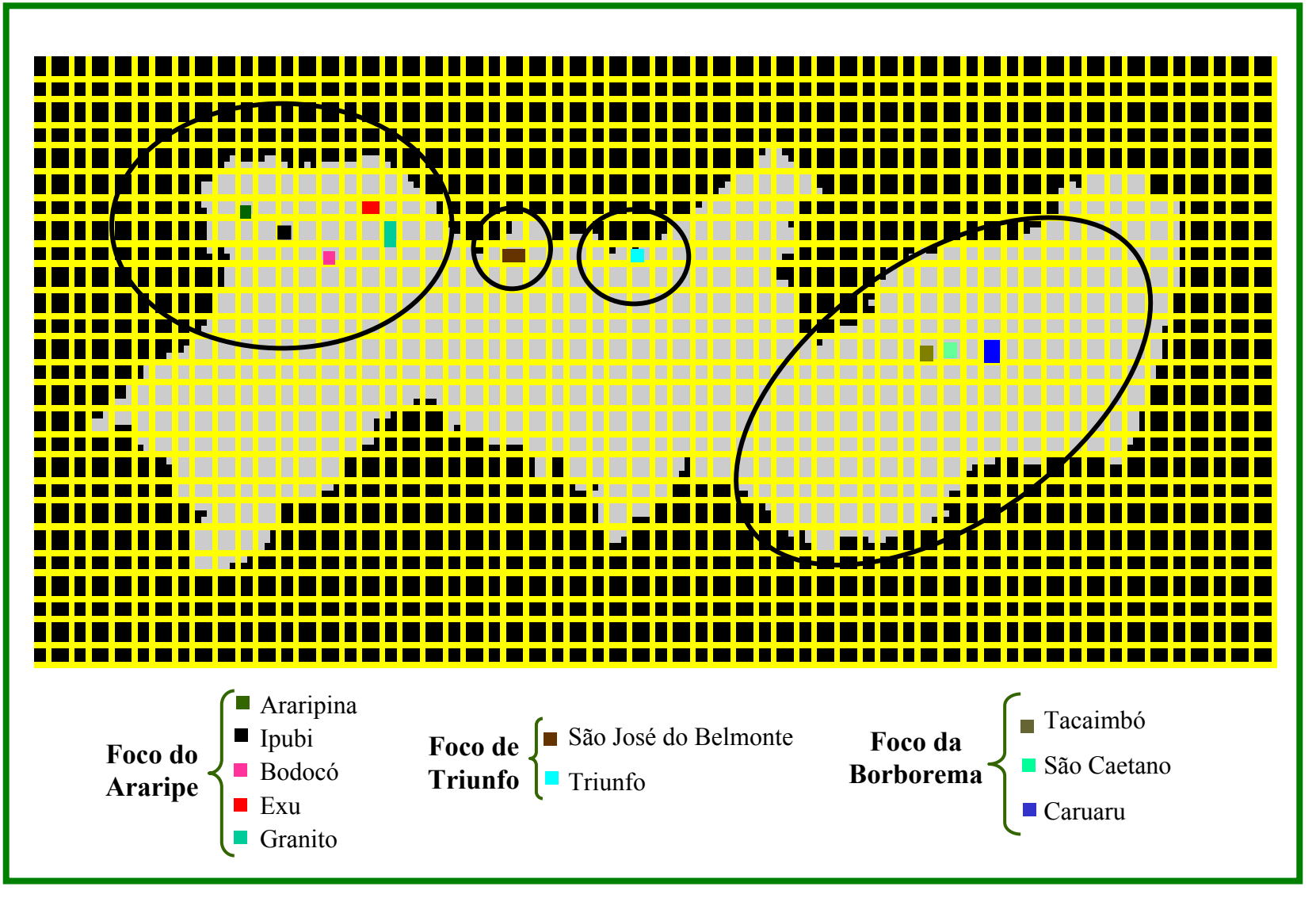


Fig. 3: Mapa do estado de Pernambuco indicando os diferentes municípios estudados pertencentes a três focos de peste

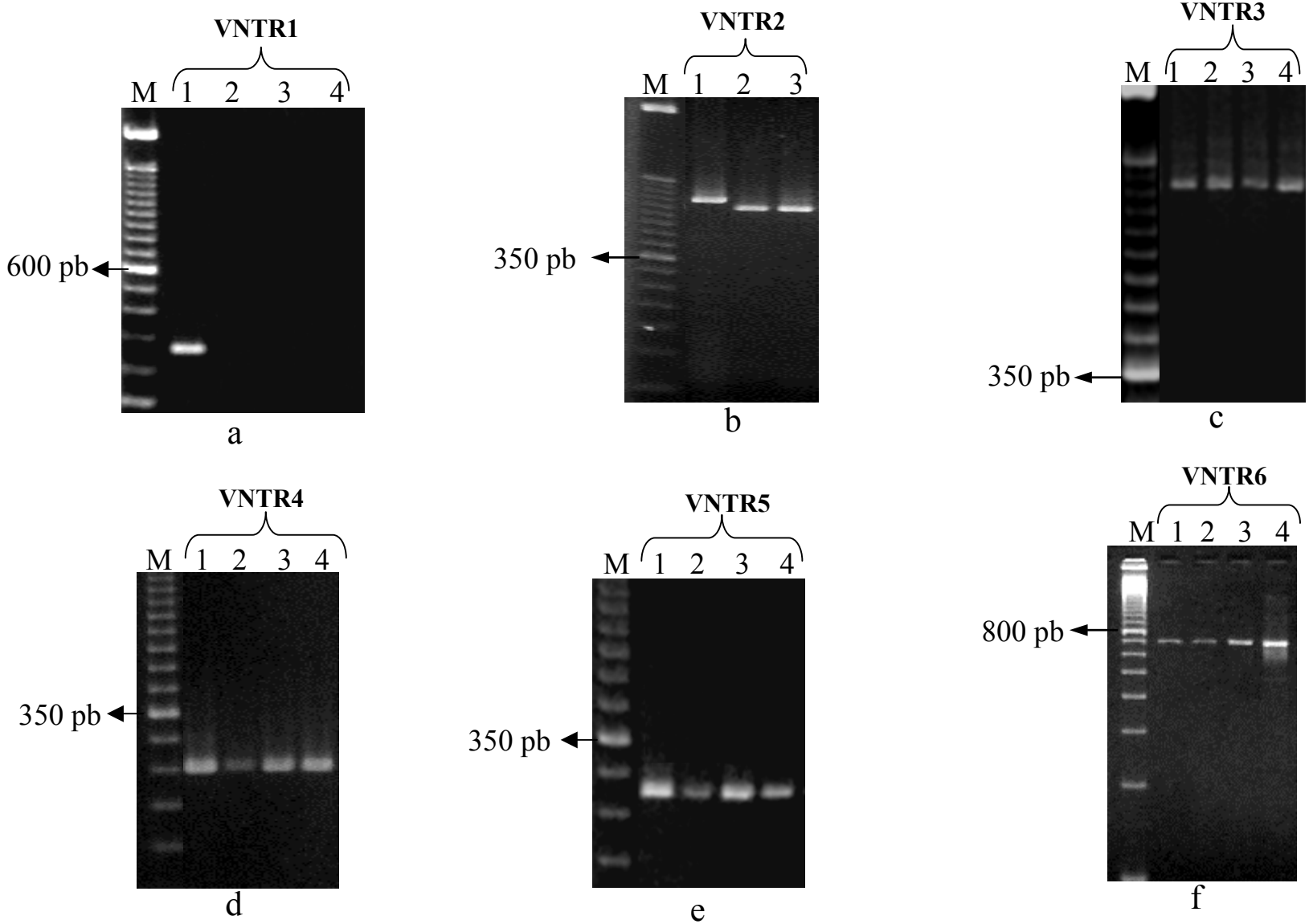


Fig. 4: Gel de agarose 2,5% representativo. (a) Linhas – 1: IP 32950 (controle positivo), 2: Ye 40, 3: Ye 25c, 4: Ye 124p; (b) Linhas – 1:Ye 102p, 2: Ye 25c, 3: Ye 124p; (c) Linhas - 1: Ye 37, 2: Ye 40, 3: Ye 41, 4: Ye 25c; (d) Linhas – 1: Ye 25c, 2: Ye 37, 3: Ye 43p, 4: Ye 25L; (e) Linhas – 1: Ye 41, 2: Ye 37, 3: Ye 102, 4: Ye 25c; (f) – Linhas: 1: Ye 25L, 2: Ye 40, 3: Ye 43p, 4: Ye 41. M: "50 – 100 pb DNA ladder".

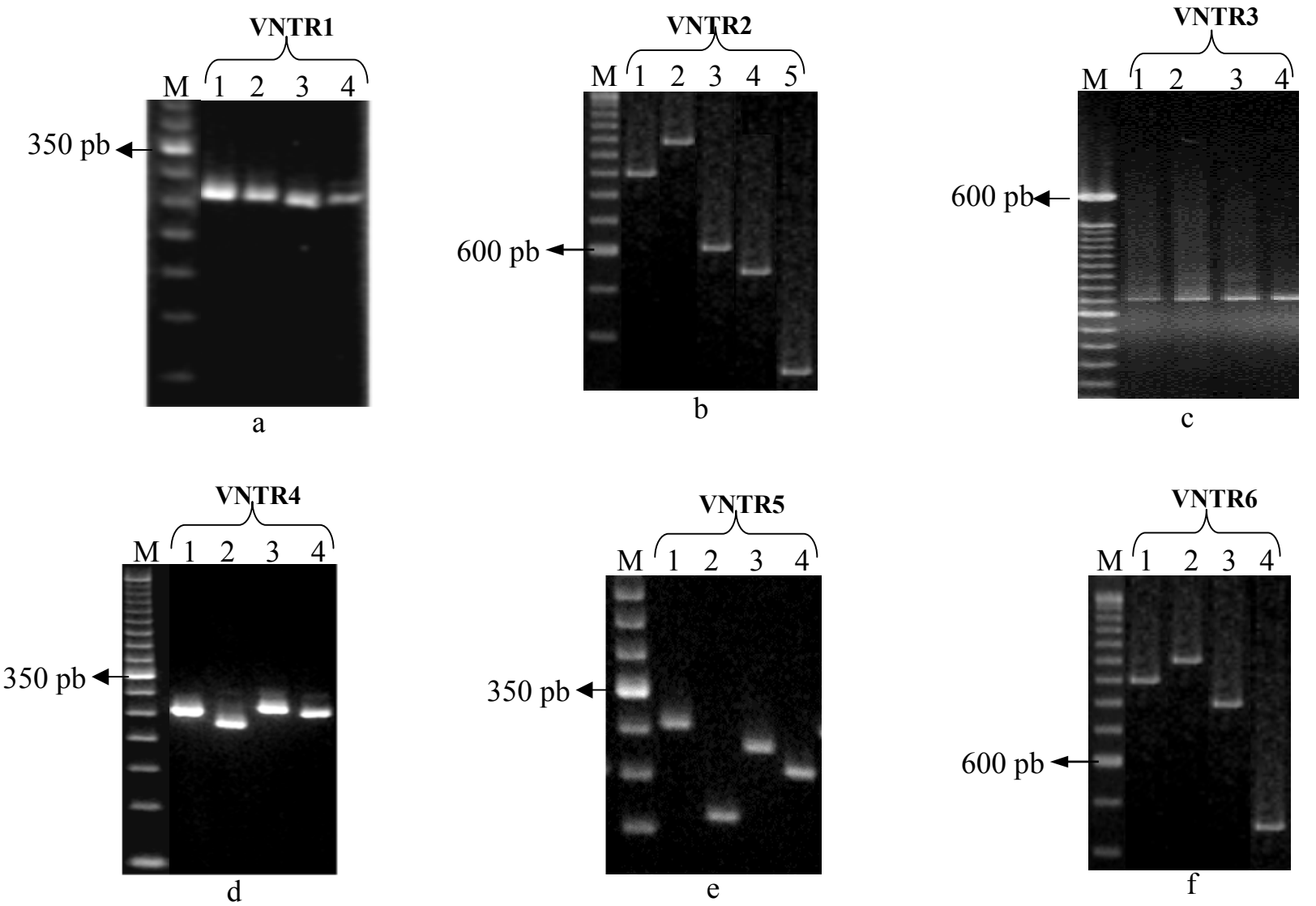


Fig. 5. Gel de agarose 2,5% representativo. (a) Linhas – 1: IP 31553, 2: IP 32950, 3: IP 32953, 4: IP 32952; (b) Linhas – 1: IP 32952, 2: IP 32953, 3: IP 31553, 4: IP 32950, 5: IP 32944; (c) Linhas – 1: IP 31553, 2: IP 32944, 3: IP 32950, 4: IP 32952; (d) Linhas – 1: IP 32944, 2: IP 32950, 3: IP 32952 , 4: IP 32953; (e) Linhas – 1: IP 31553, 2: IP 32944, 3: IP 32950, 4: IP 32952; (f) Linhas – 1: IP 32950, 2: IP 31553, 3: IP 32953, 4: IP 32944. M, "50 ou 100 pb DNA ladder".

ARTIGO II

Comparação das cepas de *Yersinia pestis* de dois focos de peste no Estado do Ceará, Brasil pelo MLVA-PCR

Maria Betânia Melo de Oliveira[1], Tereza Cristina Leal-Balbino[1], Mirele Regina de Araújo[1], Thiers Araújo Campos[1], Valdir Queiroz Balbino[2], Fabiana Laura de Almeida[1], Nilma Cintra Leal[1], Alzira Maria Paiva de Almeida[1]

[1]Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, MS.
[2]Faculdade de São Miguel.

E-mail do autor de correspondência: betania@cpqam.fiocruz.br

Palavras chave: *Yersinia pestis,* MLVA-PCR, perfis genotípicos, Ceará, Brasil.

Manuscrito a ser enviado para publicação na revista:
Genetics and Molecular Biology

Comparação das cepas de *Yersinia pestis* de dois focos de peste no Estado do Ceará, Brasil pelo MLVA-PCR

Maria Betânia Melo de Oliveira[1], Tereza Cristina Leal-Balbino[1], Mirele Regina de Araújo[1], Thiers Araújo Campos[1], Valdir Queiroz Balbino[2], Fabiana Laura de Almeida[1], Nilma Cintra Leal[1], Alzira Maria Paiva de Almeida[1]

[1]Depatamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, MS.
[2]Faculdade São Miguel.

Resumo

Seis VNTRs foram analisados por MLVA-PCR em 43 cepas de *Yersinia pestis* originadas de diferentes fontes no período de 1971 a 1997 em duas regiões pestígenas do Estado do Ceará com o objetivo de verificar se houve alguma alteração genômica nas cepas circulantes nessas áreas ao longo do tempo. Os padrões obtidos pelo MLVA permitiram diferenciar as cepas em doze perfis genotípicos. Dois perfis apresentaram ampla distribuição geográfica sendo encontrados nas duas áreas. Os demais perfis foram restritos a apenas uma região. A presença dos mesmos genótipos nas duas regiões poderia sugerir que as duas áreas constituem um só foco. Não foi observado o surgimento de novos perfis ao longo do período estudado.

Palavras-chave: *Yersinia pestis,* MLVA-PCR, perfis genotípicos, Ceará, Brasil

Endereço para correspondência: Maria Betânia Melo de Oliveira. CPqAM/FIOCRUZ/MS. Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420. Recife, PE, Brasil. Tel: 55 81 21012634 Fax: 55 81 3453 2449 e-mail:betania@cpqam.fiocruz.br

Introdução

A peste (infecção pela *Yersinia pestis*) atingiu o Estado do Ceará, em 1900, em conseqüência da sua expansão no Brasil, após introdução, em 1899. Eliminada da zona urbana, ficou fixada entre os roedores na zona rural, constituindo vários focos naturais (Baltazard, 1968; WHO, 1965). No Estado do Ceará os focos atuais estão localizados em diversos complexos ecológicos constituídos pelas serras da Ibiapaba, Baturité, Machado, Pedra Branca e Uruburetama ao norte do Estado e Chapada do Araripe ao sul (Aragão *et al*., 2002; Funasa, 2002; Vieira e Coelho 1998).

Estes focos são independentes no tempo e no espaço. O comportamento epidemiológico da peste no Estado do Ceará caracteriza-se pela ocorrência de diferentes padrões de circulação da enfermidade na população humana, alternando-se momentos de elevadas incidências, seguidos por outros momentos de baixa incidência ou mesmo ausência completa de casos, possibilitando estabelecer uma periodização cronológica com características epidemiológicas próprias (Aragão *et al*., 2002; Baltazard, 1968).

O período de 1961 a 1986 distinguiu-se por apresentar elevada incidência de casos humanos principalmente nos focos das serras da Ibiapaba e Baturité. Na serra da Ibiapaba, em 1966, dando início a um período de intensa atividade, eclodiram vários casos nos municípios de Ipu e Ipueiras e mediante rigorosa investigação ocorrida no período de 1971 a 1972, foi isolada a *Y. pestis* de material obtido por digitectomia do cadáver de um paciente residente em Guaraciaba do Norte e de aspirado de bubão e/ou sangue de 16 pacientes, nove em Guaraciaba do Norte, cinco em Ipu, um em Ipueiras e São Benedito (Almeida *et al*., 1985).

Durante a década de 1970 ocorreram vários surtos na serra de Baturité e em 1978 foram registrados cinco casos de peste bubônica positivados bacteriologicamente, um dos quais evoluiu para a forma pneumônica, em Aratuba. Na década de 1980 irrompeu outro surto que atingiu diversos municípios e vários isolados de *Y. pestis* foram obtidos de material de humanos e dos roedores e pulgas (Almeida *et al*., 1983; 1985). Constatou-se um declínio da infecção em 1986 e, após dez anos sem nenhum isolamento da bactéria foi isolada outra cepa de um caso humano em 1997 em Ipu (Aragão *et al*., 2002).

O estudo do perfil plasmidial e protéico, sensibilidade aos antimicrobianos, pigmentação no meio agar vermelho Congo e outros marcadores de virulência realizado por Cavalcanti *et al*., (2002) e Leal e Almeida (1999) não detectou diferenças associadas às características epidemiológicas das cepas isoladas nos focos do Estado do Ceará.

No presente trabalho foi realizada uma análise de múltiplos locus do número variável de *repeat* em tandem (MLVA-PCR) nas cepas de *Y. pestis* isoladas de humanos, roedores e pulgas de dois focos de peste do Estado do Ceará para verificar se houve alguma modificação ao longo do tempo nas cepas circulantes em diferentes hospedeiros nos dois focos.

Materiais e Métodos

Neste estudo foram analisadas 43 cepas de *Y. pestis* de diferentes municípios dos focos da serra da Ibiapaba e serra de Baturité (Ceará), isoladas de diferentes hospedeiros no período de 1971 a 1997 (Tabela I). Para os trabalhos, as cepas mantidas na coleção de culturas do CPqAM, foram reativadas em BHI (brain heart infusion, Difco) a 28°C por 24h e em seguida plaqueadas em meio BAB (blood agar base, Difco) incubado a 28°C por 48h. Colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI para extração do DNA genômico (Maniatis, 1989). A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V e visualizada em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) após coloração em solução de brometo de etídeo (15 mg/ml). A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *Hind* III.

Seis locos VNTRs denominados neste trabalho VNTR1 a VNTR6, foram selecionados entre os descritos na literatura e analisados com os *primers* aqui denominados 1AB a 6AB descritos por Adair *et al*., (2000); Le Flèche *et al*., (2001).

Os ensaios de PCR foram realizados em um volume final de 25µl por tubo, contendo 20ng do DNA, 20 pmol de cada *primer*, tampão (pH 8) 50 mM, desoxinucleotídeo trifosfato 0,16 mM (dNTP-Invitrogen, Brasil), $MgCl_2$ 1,5 mM, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Biometra) nas condições descritas por Adair *et al*., (2000) e Le Flèche *et al*., (2001).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão Tris-Borato-EDTA sob voltagem de 120V, corados com brometo de etídeo (15mg/mL), visualizados sob UV e digitalizados em câmera Kodak®. Foi utilizado como padrão de massa molecular o "50 e o 100 base-pair DNA ladder" (Invitrogen, Brasil).

O tamanho dos amplicons foi analisado através do programa 1D Image Analysis software, versão 3.5 da Kodak Digital Science. A quantidade de *repeats* ou unidades repetidas presentes em cada VNTR foi calculado baseado no tamanho da seqüência amplificada. O número dos *repeats* de cada amplicon foi calculado usando a fórmula: Número de *repeats* = tamanho do fragmento (pb) – região flanqueadora (pb) / tamanho do *repeat* (pb).

O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi estimado pelo método de Nei e Li (1979), utilizando o programa NTSYSpc v. 2.0 (Exeter Software, Setauket, Estados Unidos) e o agrupamento dos perfis genotípicos foi realizado pelo algoritmo UPGMA (Sneath e Sokal, 1962).

Resultados e Discussão

Houve amplificação de todos os VNTRs em todas as cepas estudadas. Para o VNTR1 o tamanho dos segmentos amplificados variou de 255 a 263 pares de base (pb) e o número de *repeats* de nove a 11. Para o VNTR2 foram amplificados segmentos de 605pb com oito *repeats* e 665pb com nove, e para o VNTR4 foram amplificados segmentos de 243pb com seis *repeats* e 250pb com sete. O VNTR3 amplificou um segmento de 700pb com 28 *repeats*, o VNTR5 270 pb com sete e o VNTR6 690 pb com dois *repeats* (Figura 1).

Diferenças no número de *repeats* dos locos VNTR1, VNTR2 e VNTR4 resultaram em vários alelos por loco variando de dois para os locos VNTR2 e VNTR4 a três alelos para o loco VNTR1. Os demais locos não apresentaram variações no número de alelos (Tabela 1, Figura 1).

Os padrões de amplificação dos seis VNTRs permitiram agrupar as cepas estudadas em 12 grupos genotípicos ou perfis genotípicos denominados de P1 a P12 (Tabela 1, Figura 2).

Os perfis P1 e P4 foram os mais freqüentemente encontrados quanto à fonte de material, local e período de isolamento. Foram encontrados nos isolados obtidos na serra da Ibiapaba e de Baturité (Figura 2, 3 e 4). O P1 foi o mais disseminado geograficamente, encontrado em vários locais dos dois focos e incluiu cepas originadas de humanos e duas espécies de roedores, *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus.* O P4 foi o mais conservado ao longo do tempo (1971 a 1997) e incluiu cepas originadas de humanos, roedor (*Galea spixii*) e pulga (*Pulex irritans*), (Figura 2).

Todos os perfis humanos foram também encontrados no *B. lasiurus* ou outra espécie de roedor. Os perfis se mostraram conservados ao longo do tempo e não houve surgimento de novo perfil.

Alterações no genoma (plasmidiais e no cromossomo) em cepas brasileiras de *Y. pestis* quando estocadas e manipuladas no laboratório foram observadas por Leal *et al*., (2000). Por outro lado Leal-Balbino et al. (2004) observaram estabilidade *in vitro* na cepa P. CE 882. O estudo do perfil plasmidial e protéico, sensibilidade aos antimicrobianos, pigmentação no meio agar vermelho Congo e outros marcadores de virulência realizado por Cavalcanti *et al*., (2002) não detectou diferenças associadas às características epidemiológicas das cepas do Ceará.

As serras da Ibiapaba e Baturité são consideradas focos independentes por Vieira e Coelho (1998). Entretanto, segundo Baltazard (1968) as serras da Ibiapaba e Baturité constituem um só foco (Foco do Norte do Ceará). Nos períodos de expansão da zoonose que ocorrem sob determinadas condições ecológicas que favorecem a proliferação dos roedores reservatórios e pulgas vetores as duas áreas se confundem (Baltazard, 1968). Lowell et al., (2005) encontraram homologia em cepas de um surto e mostraram que cepas não relacionadas epidemiologicamente apresentam diferentes perfis por MLVA.

A identificação dos mesmos perfis genotípicos nas duas áreas estudadas poderia reforçar a hipótese de Baltazard (1968) de que as duas áreas estudadas constituem um só foco. No entanto, outros estudos (manuscritos em preparação) mostraram a ocorrência de cepas com perfis similares em diferentes focos brasileiros e de outros países.

Referências

Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P (2000) Diversity in a Variable-Number Tadem Repeat from *Yersinia pestis*. J Clin Microbiol 38: 1516-1519.

Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR (1985) Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Rev Ins. Med trop São Paulo 27: 207-218.

Almeida CR, Almeida AMP, Brasil DP, Leal MF, Lima, JWO (1983) Situação da pesteno Brasil no ano de 1982. Anais do XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, RJ p. 149.

Aragão AI, Seoane ACM, Leal TCA, Leal NC (2002) Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1991-1999. Rev Soc Bras Med Trop 35:143-148.

Baltazard M (1968) Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. Rev Bras Malariol Trop 20: 335-366.

Cavalcanti YVN, Leal NC, Almeida, AMP (2002) Typing of *Yersinia* pestis isolates from the State of Ceará, Brazil. Letters Applied Microbiol 35: 543-547.

Funasa (2002) Peste in: Guia de Vigilância Epidemiológica 5: 641-652.

Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G (2001) A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. BMC Microbiol 1:2.

Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CV, Almeida AM (2004) Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. Mem Inst. Oswaldo Cruz 7: 727-32.

Leal NC, Sobreira M, Leal TCA, Almeida AMP (2000) Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in brasilian *Yersinia pestis*. *Brazilian* J Microbiol 31: 20-24.

Leal NC, Almeida AMP (1999) Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. Rev Inst Med Trop São Paulo 41: 339-342.

Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu M, Gage KL (2005) Identifying sources of human exposure to plague. J Clin Microbiol 43: 650-656.

Maniatis T, Frisch E, Sambrook J (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci 76: 5267-5273.

Sneath PHA, Sokal RR 1962. Numerical Taxonomy. *Nature 3*: 855-860.

Vieira JBF, Coelho GE (1998) Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop 31 (Supl. II): 112-119.

World Health Organization (1965) Plague in the Americas. Scient Publ Nº 115: 44-68.

Tabela I - Características gerais de cepas de *Y. pestis* isoladas de dois focos de peste do Estado do Ceará

Cepas	Origem								Perfil Genotípico
	Ano	Fonte	Foco	Município - Estado	Sítio	VNTR1	VNTR2	VNTR4	
P. Exu 509	1971	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Timbauba	263/11	605/8	250/7	P1
P. Exu 527	1971	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Buriti Apuá	259/10	605/8	250/7	P2
P. Exu 538	1971	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Mato Grosso	259/10	665/9	250/7	P9
P. Exu 540	1971	Humano	Ibiapaba	Ipueiras - CE	Povoado América	263/11	605/8	250/7	P1
P. Exu 541	1971	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	255/9	605/8	250/7	P4
P. Exu 542	1971	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Lagoa do Firmino	263/11	605/8	243/6	P8
P. Exu 554	1971	Humano	Ibiapaba	São Benedito - CE	Pimenteira	263/11	605/8	243/6	P8
P. Exu 556	1972	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	255/9	605/8	250/7	P4
P. Exu 557	1972	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Povoado Igazeira	255/9	665/9	250/7	P10
P. Exu 558	1972	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Macambeira	263/11	665/9	250/7	P6
P. Exu 789	1978	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	259/10	665/9	250/7	P9
P. Exu 792	1978	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Cabeça Dantas	259/10	605/8	243/6	P11
P. Exu 795	1978	Humano	Baturité	Aratuba - CE	Serrinha	263/11	605/8	250/7	P1
P. Exu 796	1978	Humano	Baturité	Aratuba - CE	Serrinha	263/11	605/8	250/7	P1
P. Exu 797	1978	RR	Ibiapaba	Ipu - CE	Almas	259/10	665/9	243/6	P3
P. Exu 801	1978	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Tabocal	263/11	605/8	243/6	P8
P. Exu 804	1978	Humano	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Santo Amaro	263/11	665/9	250/7	P6
P. Exu 807	1978	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Taboca	263/11	665/9	250/7	P6
P. Exu 809	1979	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Macaco	259/10	665/9	243/6	P3
P. Exu 833	1979	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	263/11	605/8	250/7	P1
P. Exu 835	1979	BL	Ibiapaba	Ipu - CE	Taboca	259/10	605/8	243/6	P11
P. Exu 842	1979	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	255/9	665/9	243/6	P12
P. Exu 861	1980	BL	Ibiapaba	Ipueiras - CE	Grossos	255/9	605/8	243/6	P5
P. CE 01	1978	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Cabeça Dantas	259/10	605/8	243/6	P11
P. CE 03	1979	BL	Ibiapaba	Ipu - CE	Tabocal	263/11	665/9	243/6	P7

P. CE 04	1979	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	263/11	665/9	250/7	P6
P. CE 05	1979	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	263/11	665/9	243/6	P7
P. CE 06	1979	*	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	263/11	665/9	243/6	P7
P. CE 07	1979	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	São Félix	263/11	665/9	243/6	P7
P. CE 09	1980	BL	Ibiapaba	Ipueiras - CE	Santa Maria	263/11	605/8	243/6	P8
P. CE 11	1982	BL	Ibiapaba	Ipu - CE	Tabocal	263/11	605/8	250/7	P1
P. CE 13	1982	BL	Baturité	Maranguape - CE	Santo Amaro	263/11	605/8	250/7	P1
P. CE 14	1982	PI	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Garrancho Velho	255/9	605/8	250/7	P4
P. CE 17	1982	BL	Baturité	Aratuba - CE	Outeiro	263/11	605/8	250/7	P1
P. CE 18	1982	BL	Ibiapaba	Ipueiras - CE	Almas	259/10	605/9	250/7	P2
P. CE 19	1982	BL	Ibiapaba	Ipueiras - CE	Grossos	263/11	665/9	250/7	P6
P. CE 20	1982	BL	Ibiapaba	Ibiapina - CE	Araçás	263/11	665/9	250/7	P6
P. CE 21	1982	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Baixinha	263/11	605/8	250/7	P1
P. CE 24	1982	RR	Baturité	Redenção - CE	Miranda	263/11	605/8	250/7	P1
P. CE 25	1983	BL	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Lagoa da Cruz	263/11	605/8	243/6	P8
P. CE 28	1982	GS	Baturité	Mulungú - CE	Camará	255/9	605/8	250/7	P4
P. CE 30	1986	CC	Ibiapaba	Guaraciaba do Norte - CE	Paraíso	259/10	665/9	250/7	P9
P. CE 882	1997	Humano	Ibiapaba	Ipu - CE	Ipuzinho	255/9	605/8	250/7	P4

* Sem informação; BL: *Bolomys lasiurus*, RR: *Rattus rattus*, PI: *Pulex irritans*, GS: *Galea spixii*; CC: *Calomys callosus*

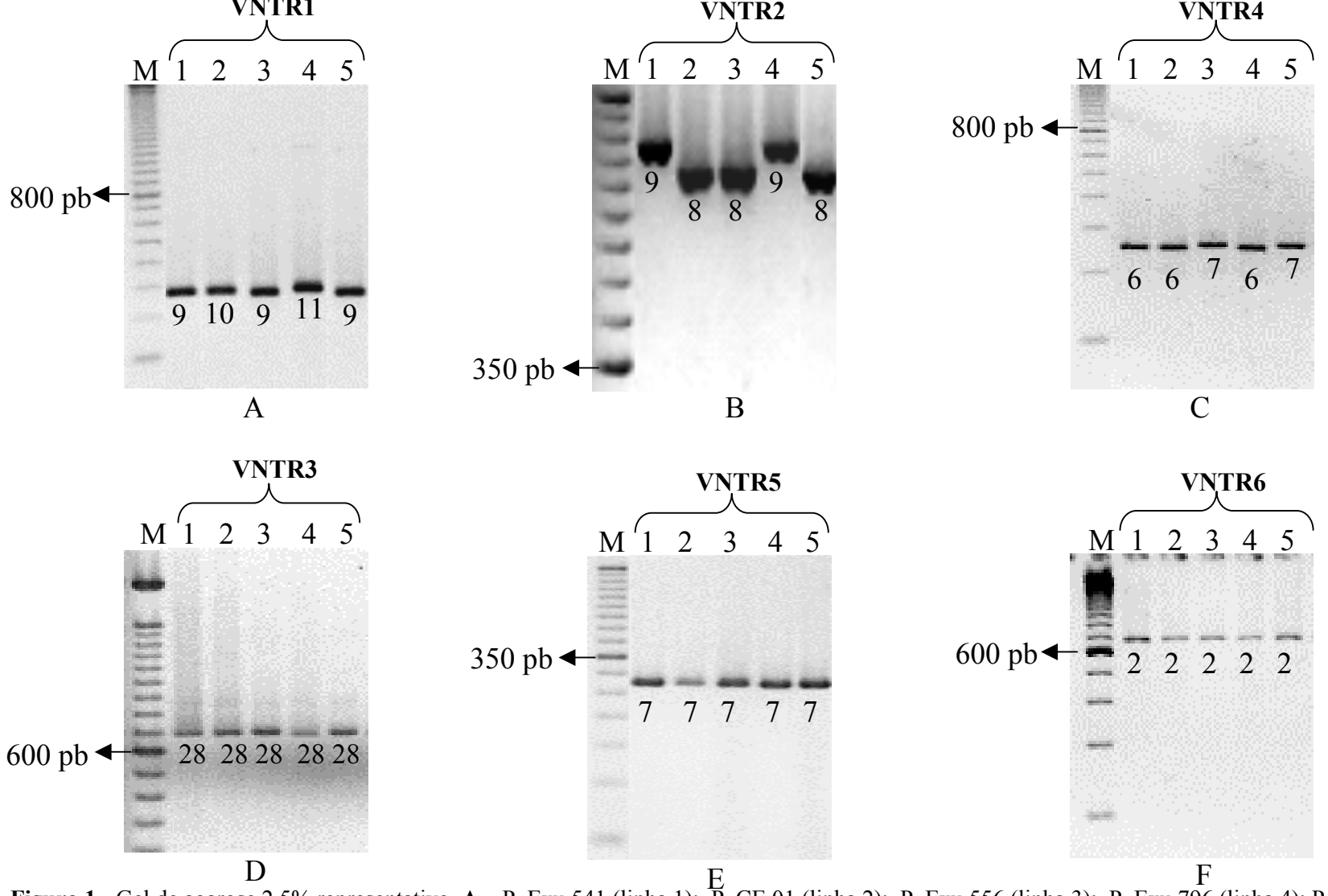


Figura 1 - Gel de agarose 2,5% representativo. **A –** P. Exu 541 (linha 1); P. CE 01 (linha 2); P. Exu 556 (linha 3); P. Exu 796 (linha 4); P. Exu 557 (linha 5). **B –** P. Exu 789 (linha 1); P. Exu 792 (linha 2); P. CE 09 (linha 3); P.CE 07 (linha 4); P. Exu 542 (linha 5). **C –** P. Exu 541 (linha 1); P. Exu 804 (linha 2); P. CE 06 (linha 3); P. Exu 833 (linha 4); P. CE 861 (linha 6).**D –** P. CE 03 (linha 1); P. CE 05 (linha 2); P. CE 14 (linha 3); P. Exu 554 (linha 4); P. Exu 509 (linha 5). **E –**P. Exu 540 (linha 1); P. Exu 801 (linha 2); P. CE 07 (linha 3); P. CE 21 (linha 4); P. CE 28 (linha 5). **F –** P. CE 19 (linha 1); P. CE 04 (linha 2); P. Exu 557 (linha 3); P. Exu 789 (linha 4); P. Exu 842 (linha 5). M. "50 e 100 pb DNA

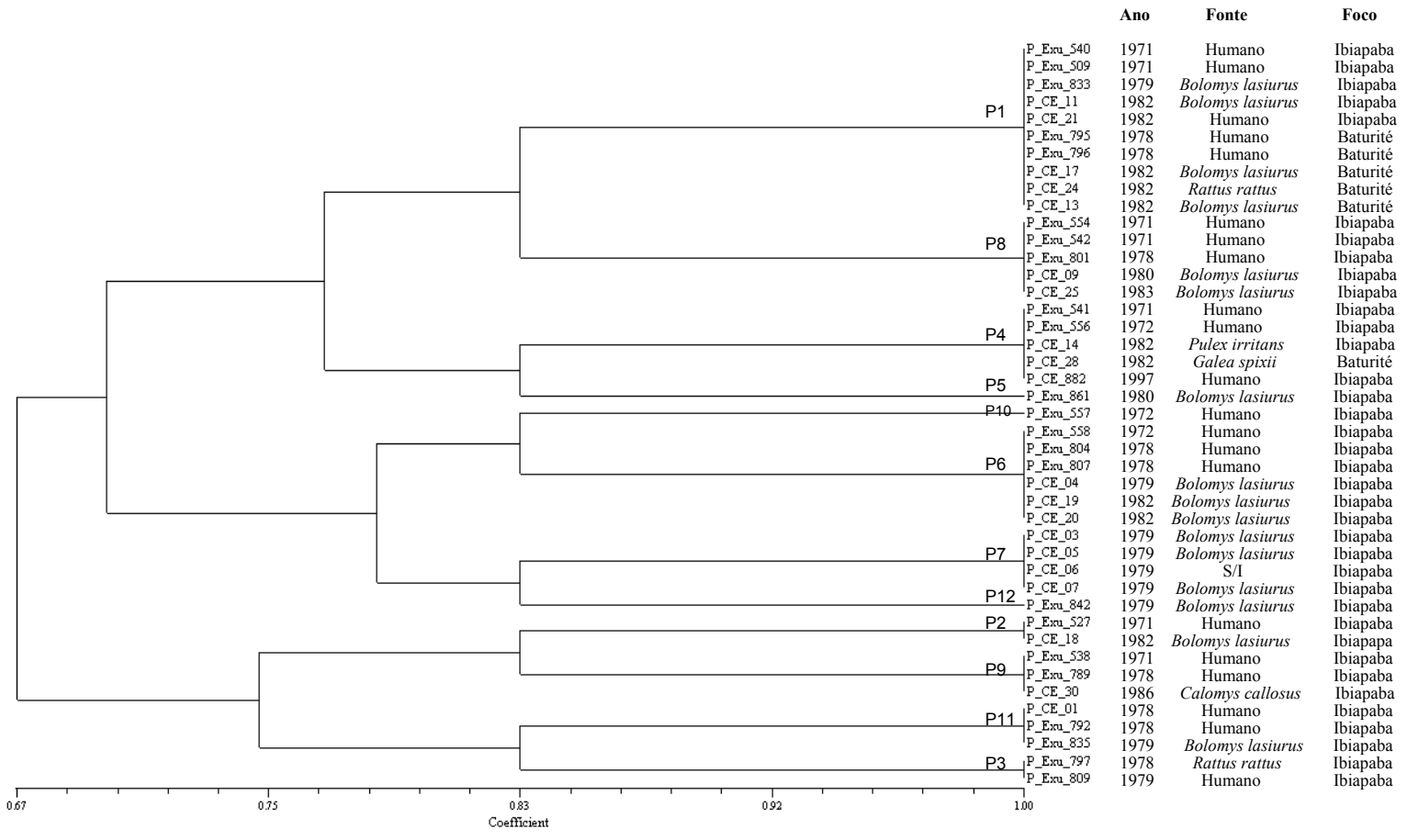
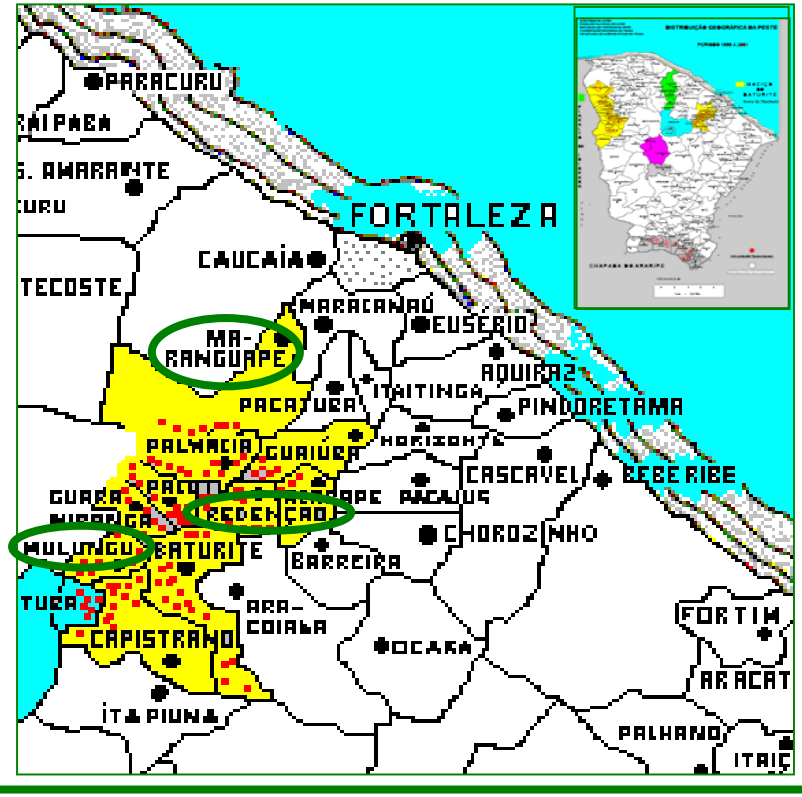
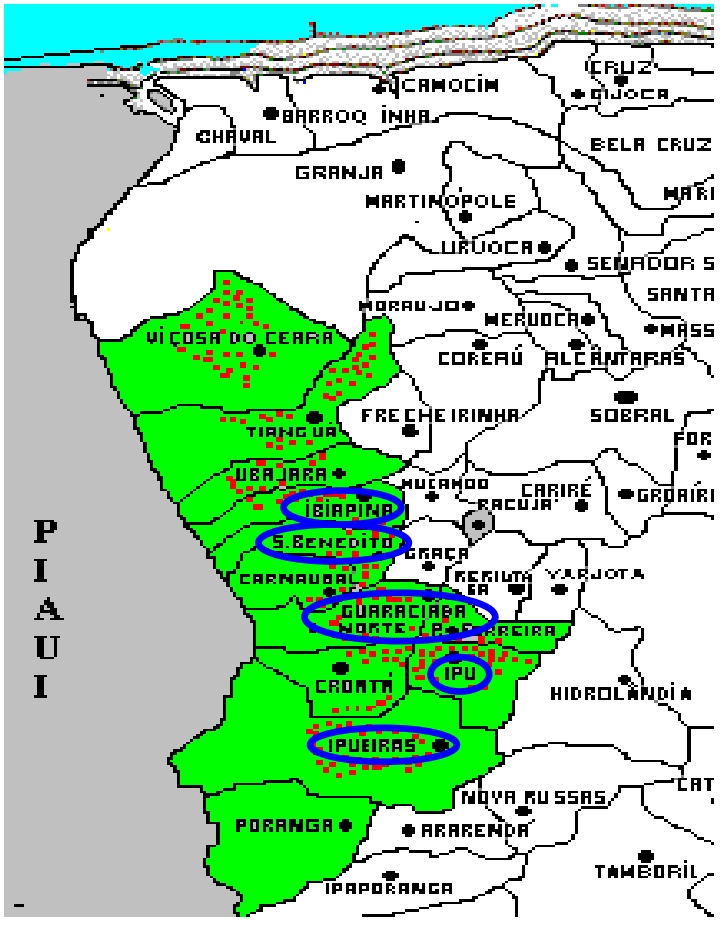


Figura 2 - Dendrograma construído baseado na análise de 43 cepas de *Y. pestis* isoladas de dois focos de peste no Estado do Ceará



MUNICÍPIO	PERFIS GENOTÍPICOS
Aratuba	P1
Redenção	P1
Maranguape	P1
Mulungú	P4

Figura 3 - Distribuição espacial dos perfis genotípicos encontrados em cepas de *Y. pestis* na Serra de Baturité estado do Ceará



MUNICÍPIO	PERFIS GENOTÍPICOS
Ibiapina	P6
São Benedito	P8
Guaraciaba do Norte	P1/P2/P4/P6/P7/P8/P9/P12
Ipu	P1/P3/P4/P6/P7/P8/P9P/10/P 11
Ipueiras	P1/P2/P5/P6/P8

Figura 4 - Distribuição espacial dos perfis genotípicos encontrados em cepas de *Y. pestis* na Serra da Ibiapaba do estado do Ceará

ARTIGO III

Diversidade Genética em Cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante um surto de peste no Estado na Paraíba

M.B.M Oliveira[1], T.C. Leal-Balbino[1], T.A. Campos[1], M.R. Araújo[1], V.Q. Balbino[2], F.L. Almeida[1], N.C. Leal, A.M.P. Almeida[1].

[1]Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, MS.
[2]Faculdade de São Miguel.

E-mail do autor de correspondência: betania@cpqam.fiocruz.br

Palavras Chave: *Yersinia pestis,* peste, surto, VNTRs, genotipagem

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista

Letters in Applied Microbiology

Diversidade Genética em Cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante um surto de peste no Estado na Paraíba

M.B.M Oliveira[1], T.C. Leal-Balbino[1], T.A. Campos[1], M.R. Araújo[1], V.Q. Balbino[2], F.L. Almeida[1], N.C. Leal, A.M.P. Almeida[1].

[1]Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.
[2]Faculdade de São Miguel.

RESUMO

Objetivos: verificar se isolados de *yersinia pestis* obtidos no mesmo evento epidemiológico são geneticamente homogêneos e avaliar a estabilidade *in vitro* dos vntrs em cepas de *y. pestis*.

Métodos e Resultados: Foram analisados seis locos VNTRs em 19 cepas isoladas em um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil e em três culturas de *Y. pestis* não relacionadas (duas de dois diferentes focos de peste brasileiros e uma de outro foco sul-americano: Peru) e 11 sub-culturas derivadas das cepas parentais. Pelos padrões de amplificação obtidos as 19 cepas foram distribuídas em seis perfis genotípicos. Não foram observadas modificações nos VNTRs nas culturas parentais e derivadas.

Conclusões: Os resultados obtidos com a estabilidade dos VNTRs nas culturas derivadas sugerem que as variações detectadas nas cepas de *Y. pestis* isoladas de um surto de peste no Estado da Paraíba foram modificações ocorridas ainda na natureza ao longo do tempo e não ocorridas em laboratório durante o período de estocagem.

Significância e Impacto do Estudo: A diversidade encontrada nas cepas de *Y. pestis* revela que possivelmente populações distintas dessa espécie circularam na área do foco durante o surto de peste em 1986 e demonstra que os VNTRs podem ser utilizados como marcador molecular na tipagem de cepas.

Palavras Chave: *Yersinia pestis,* peste, surto, VNTRs, genotipagem

[*]Endereço para correspondência: Maria Betânia Melo de Oliveira. CPqAM/FIOCRUZ/MS. Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670-420. Recife, PE, Brasil. Tel: 55 81 21012634 Fax: 55 81 3453 2449; e-mail: betania @cpqam.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

A peste, infecção pela *Yersinia pestis* foi registrada pela primeira vez, no Estado da Paraíba, em 1912. A zoonose disseminou-se pela zona rural e fixou-se em duas áreas independentes: nos municípios de Manaíra e Princesa Isabel, que junto com o município de Triunfo (Pernambuco) formam um pequeno foco bem circunscrito, denominado, foco de Triunfo. A outra área faz parte de um foco bastante extenso que se estende pelo Planalto da Borborema, abrangendo vários municípios dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas (Baltazard 1968).

Vários surtos de peste humana foram registrados nas duas áreas a intervalos de silêncio de até dez anos (FUNASA 2002; Vieira e Coelho 1998). Almeida *et al*. (1985) detectaram atividade pestosa em roedores e suas pulgas associadas à infecção humana, no Foco de Triunfo, e nos roedores, na ausência de casos humanos, no Foco do Planalto da Borborema.

Após dez anos de quiescência, em setembro de 1986 irrompeu um surto de peste humana na área paraibana do Foco do Planalto da Borborema atingindo vários municípios. Foram isoladas 19 cepas de *Y. pestis* de humanos (três cepas) e roedores (16 cepas) (Almeida *et al*. 1989). Os isolados foram analisados quanto à presença de fatores de virulência e perfil plasmidial (Leal *et al.* 1989) e protéico (Abath *et al.* 1989). Todas as cepas se revelaram proficientes quanto aos fatores de virulência analisados e revelaram um perfil plasmidial homogêneo composto pelos três plasmídios prototípicos (Leal *et al.* 1989) além de uma banda extra de DNA (Leal *et al*. 2000). O perfil das proteínas de membrana externa dessas cepas também se revelou bastante homogêneo (Abath *et al*. 1989).

No presente trabalho os isolados obtidos durante o surto de peste do foco da Chapada da Borborema foram analisados por MLVA-PCR para verificar a existência de diversidade genética entre eles.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seis locos VNTRs descritos na literatura (Adair *et al*. 2000, Le Fleche *et al*. 2001) denominados no presente trabalho VNTR1 a VNTR6, foram analisados nas 19 cepas de *Y. pestis* obtidas durante o surto de peste no Estado da Paraíba em 1986 (Almeida *et al*. 1989). As cepas mantidas na coleção de culturas do Departamento de Microbiologia do CPqAM/Fiocruz foram crescidas para os trabalhos em BHI (brain heart infusion, Difco) a 28°C por 24h e em seguida

plaqueadas em meio BAB (blood agar base, Difco) incubado a 28°C por 48h. Colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI para extração do DNA genômico.

Para verificar a estabilidade dos VNTRs *in vitro* foram analisadas três culturas e 11 subculturas obtidas por repiques sucessivos das cepas P. CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 (Leal-Balbino *et al*. 2004).

O DNA genômico foi obtido pela lise das células com lisozima e proteinase K seguido de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, precipitação com isopropanol e ressusspenso em água. O DNA obtido foi quantificado por comparação com uma quantidade conhecida do DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III após eletroforese em gel de agarose 1%.

Para análise dos VNTRs foram utilizados seis pares de *primers* denominados neste trabalho: 1AB (descrito por Adair *et al*. 2000) e cinco pares de *primers* aqui denominados 2AB a 6AB (descritos por Le Flèche *et al*. 2001) nas condições descritas (Adair *et al*. 2000, Le Flèche *et al*. 2001).

A mistura de reação em um volume final de 25µl por tubo, continha 20 ng de DNA molde, 20 pmol de cada *primer*, tampão (pH 8) 50 mM, desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-Invitrogen, Brasil), $MgCl_2$ 1,5 mM, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). Para avaliar a reprodutibilidade dos resultados as reações de PCR com os diferentes *primers* foram repetidas três vezes.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão Tris-Borato-EDTA sob voltagem de 120V, corados com brometo de etídeo (15 mg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e digitalizados em câmera Kodak®. Foi utilizado como padrão de massa molecular o "50 e o 100 base-pair DNA ladder" (Invitrogen, Brasil).

Para identificar o tamanho dos amplicons foi utilizado o programa 1D Image Analysis software, versão 3.5 da Kodak Digital Science. O número dos *repeats* de cada amplicon foi calculado usando a fórmula: número de *repeats* = tamanho do fragmento (pb)-região flanqueadora (pb)/tamanho do *repeat* (pb). O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi estimado pelo método de Nei e Li (1979), utilizando o programa NTSYSpc v. 2.0 (Exeter

Software, Setauket, Estados Unidos) e o agrupamento dos perfis genotípicos foi realizado pelo algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal, 1962).

Para confirmar o tamanho e o número dos *repeats* determinados pelo MLVA-PCR, foram selecionados *amplicons* obtidos com os diferentes *primers* utilizados. Para o sequenciamento os *amplicons* selecionados foram purificados com o kit purelink PCR purification (Invitrogen, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos *primers* usados para as amplificações da PCR, no seqüenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), usando o "*Bigdye Kit*" (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas: BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al*. 1997); Seq Tools V. 8.3.022 (http://www.seqtool.dk) e Bio Edit V. 7.0.5.2 (Hall 1999). O número de *repeats* foi determinado pelo progama Tandem repeats finder (Benson 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de MLVA-PCR todos os seis locos VNTRs foram amplificados nas amostras estudadas. Os locos VNTR3, VNTR5 e VNTR6 se revelaram monomórficos: apenas foi obtido um segmento de 700 pares de base (pb) com 28 *repeats* para o loco VNTR3, de 270 pb com sete *repeats* para o VNTR5 e 690 pb com dois *repeats* para o VNTR6 (Figura 1C, E, F). Os locos VNTR1, VNTR2 e VNTR4 se mostraram polimórficos. O VNTR1 foi o mais polimórfico, gerando fragmentos de 255, 259 e 263 pb e o número *repeats* variou de nove a 11. O loco VNTR2 amplificou fragmentos de 605 pb com oito *repeats* e 665 pb com nove e o loco VNTR4 gerou fragmentos de 243 com seis *repeats* e 250 pb com sete (Figura 1A, B, D; Tabela I).

A análise do dendrograma baseado no padrão de amplificação dos seis locos VNTRs permitiu agrupar as cepas estudadas em seis perfis genotípicos denominados neste trabalho de P1 a P6 (Figura 2).

Os seis perfis foram encontrados nas cepas de alguma espécie de roedor e as cepas de origem humana foram enquadradas em dois perfis (P1 e P4). Estes dois perfis também foram encontrados no *Bolomys lasiurus*. Este roedor foi considerado o principal responsável pela epizootização da peste nos focos do nordeste do Brasil, e suas pulgas, *Polygenis spp.,*

responsáveis pela gênese de numerosos casos humanos (Baltazard, 2004). O perfil P4 foi o mais disseminado por localidade e fonte de material. Curiosamente este perfil não ocorreu nas cepas originadas dos *Rattus rattus* que foi a espécie que apresentou a maior variedade de perfis (Tabela I, Figura 2; 3).

Leal-Balbino et al. (2004) e Leal et al. (1999; 2000) observaram alterações no genoma (plasmidiais e no cromossomo) em cepas brasileiras de *Y. pestis* quando estocadas e manipuladas no laboratório. Em vista disso podia-se supor que a diversidade observada nas cepas do surto da Paraíba poderia ter sido resultado de alterações *in vitro.* No entanto, a análise dos VNTRs nas cepas parentais e nas culturas derivadas das cepas P. CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 não detectou alteração nesses locos (Tabela II; Figura 4).

A estabilidade observada em gel de agarose nas diferentes culturas derivadas das cepas P. CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 foi comprovada pelo sequenciamento do loco VNTR1. O tamanho dos *amplicons* e o número de *repeats* foi idêntico nas culturas parentais e derivadas. Estes resultados comprovam que os VNTRs correspondem a regiões do genoma com elevada estabilidade genética quando analisadas *in vitro* (Keim et al. 2000; Adair et al. 2000).

Em conclusão, as análises dos VNTRs permitiram identificar polimorfismo genético nas 19 cepas de *Y. pestis* isoladas durante o surto de peste ocorrido no Estado da Paraíba em 1986. A diversidade encontrada foi relacionada a três locos VNTRs polimórficos (VNTR1, VNTR2 e VNTR4). O MLVA-PCR permitiu por um lado, encontrar o mesmo perfil genotípico em cepas isoladas de diferentes locais (sítios e municípios) e por outro lado, cepas originadas da mesma fonte como as dos *R. rattus* com grande variedade de perfis genotípicos. A identificação de diferentes genótipos em cepas isoladas de uma mesma área geográfica, ano e fonte de isolamento sugerem que populações distintas de *Y. pestis* circulavam na área do foco durante o surto de peste em 1986. Apesar da ocorrência de diversas alterações em outras regiões do genoma das cepas brasileiras de *Y. pestis* os locos VNTRs analisados se mostraram estáveis *in vitro* e podem ser utilizados como marcadores na tipagem das cepas.

REFERÊNCIAS

Abath F.G.C., Almeida A.M.P., Ferreira L.C.S. (1989) Electrophoretic characterization of the outer membrane proteins of *Yersinia pestis* isolated in Northeast Brazil. *Epidemiology and Infection* **103,** 595-602.

Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. (2000) Diversity in a Variable-Number Tadem Repeat from *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38,** 1516-1519.

Almeida A.M.P., Brasil D.P., Leal N.C., Melo M.E.B., Rego R.V.B., Almeida C.R. (1989) Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* **84,** 249-256.

Almeida A.M.P., Brasil D.P., Carvalho F.G., Almeida C.R. (1985) Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **27,** 207-218.

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

Baltazard M. (1968) Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Rev Bras Malariol D Trop* **20,** 335-366.

Benson G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **5,** 573-580.

Funasa 2002. Peste in: *Guia de Vigilância Epidemiológica* **5**, 641-652.

Hall T.A. (1999) ioEdit a user-friendly biological sequence aligment editor and analysis program for windows. *Nucleic Acids SympSer 41*: 95-98.

Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **182,** 2928-36.

Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. (2001) A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus Anthracis*. *BMC Microbiology* 1:2.

Leal-Balbino T.C., Leal N.C., Lopes C.V., Almeida A.M. (2004) Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* **7,** 727-32.

Leal N.C., Almeida, A.M.P., Ferreira L.C. (1989) Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraiba State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **31**, 259-300.

Leal, NC., Almeida, AMP (1999) Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **41**, 339-342.

Leal, N.C, Sobreira, M., Leal, T.C.A., Almeida, A.M.P. (2000) Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in brasilian *Yersinia pestis*. *Brazilian Journal of Microbiology* **31,** 20-24.

Nei, M., Li, W-H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76,** 5267-5273.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1962) Numerical Taxonomy. *Nature* **3,** 855-860.

Vieira, J.B.F., Coelho, G.E. (1998) Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **31**, 112-119.

Tabela I - Perfis genotípicos de cepas de *Y. pestis* isoladas de um surto de peste no Estado da Paraíba analisadas pelo MLVA-PCR

Cepa	Origem			VNTR1	VNTR2	VNTR4	Perfil Genotípico
	Fonte	Município	Sítio				
P.PB 862	Humano	Solânea	Pedra D' água	263/11	605/8	250/7	P1
P.PB 863	Humano	Santa Rosa	Malhada da Catingueira	263/11	605/8	250/7	P1
P.PB 864	RR	Solânea	Pedra D' água	259/10	605/8	250/7	P2
P.PB 865	BL	Solânea	Cinco Lagoas	263/11	605/8	250/7	P1
P.PB 866	RR	Solânea	Valério	259/10	665/9	243/6	P3
P.PB 867	BL	Solânea	Lagoa do Serrote	259/10	605/8	250/7	P2
P.PB 868	BL	Solânea	Cinco Estrelas	255/9	605/8	250/7	P4
P.PB 869	HS	Solânea	Pedra D' água	255/9	605/8	250/7	P4
P.PB 870	BL	Solânea	Pedra D' água	263/11	605/8	250/7	P1
P.PB 871	BL	Solânea	Pedra D' água	259/10	605/8	250/7	P2
P.PB 872	BL	Solânea	Cinco Lagoas	255/9	605/8	250/7	P4
P.PB 873	OS	Solânea	Cinco Lagoas	259/10	605/8	250/7	P2
P.PB 874	RR	Solânea	Bacalhau	255/9	605/8	271/10	P5
P.PB 876	RR	Solânea	Cinco Lagoas	263/11	665/9	250/7	P6
P.PB 877	RR	Solânea	Cinco Lagoas	263/11	605/8	250/7	P1
P.PB 878	OS	Solânea	Bacalhau	255/9	605/8	250/7	P4
P.PB 879	OS	Solânea	Pedra D' água	255/9	605/8	250/7	P5
P.PB 880	OS	Solânea	Bacalhau	255/9	605/8	250/7	P4
P.PB 881	Humano	Remígio	Serrinha	255/9	605/8	250/7	P4

BL: *Bolomys lasiurus*, RR: *Rattus rattus*, OS: *Oryzomys subflavus*, HS: *Holochilus sciureus*

Tabela II –Características das cepas P. CE 882, P. Exu 340 e P. Peru 375 e suas derivadas analisadas pelo MLVA-PCR

Identificação	Número de subculturas	Perfil	VNTR1 (pb)/ nº de repeats	VNTR2 (pb)/ nº de repeats	VNTR3 (pb)/ nº de repeats	VNTR4 (pb)/ nº de repeats	VNTR5 (pb)/ nº de repeats	VNTR6 (pb)/ nº de repeats
P. CE 882	Estoque	7	255/4	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 882/4	4	7	255/4	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 882/18	18	7	255/4	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 882/22	22	7	255/4	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 882/32	32	7	255/4	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
P. Exu 340	Estoque	8	259/10	545/7	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 340/10	10	8	259/10	545/7	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 340/12	12	8	259/10	545/7	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 340/15	15	8	259/10	545/7	700/28	250/7	270/7	690/2
P. Peru 375	Estoque	9	259/10	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 375/4	4	9	259/10	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 375/10	10	9	259/10	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 375/16	16	9	259/10	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2
YP 375/22	22	9	259/10	605/8	700/28	250/7	270/7	690/2

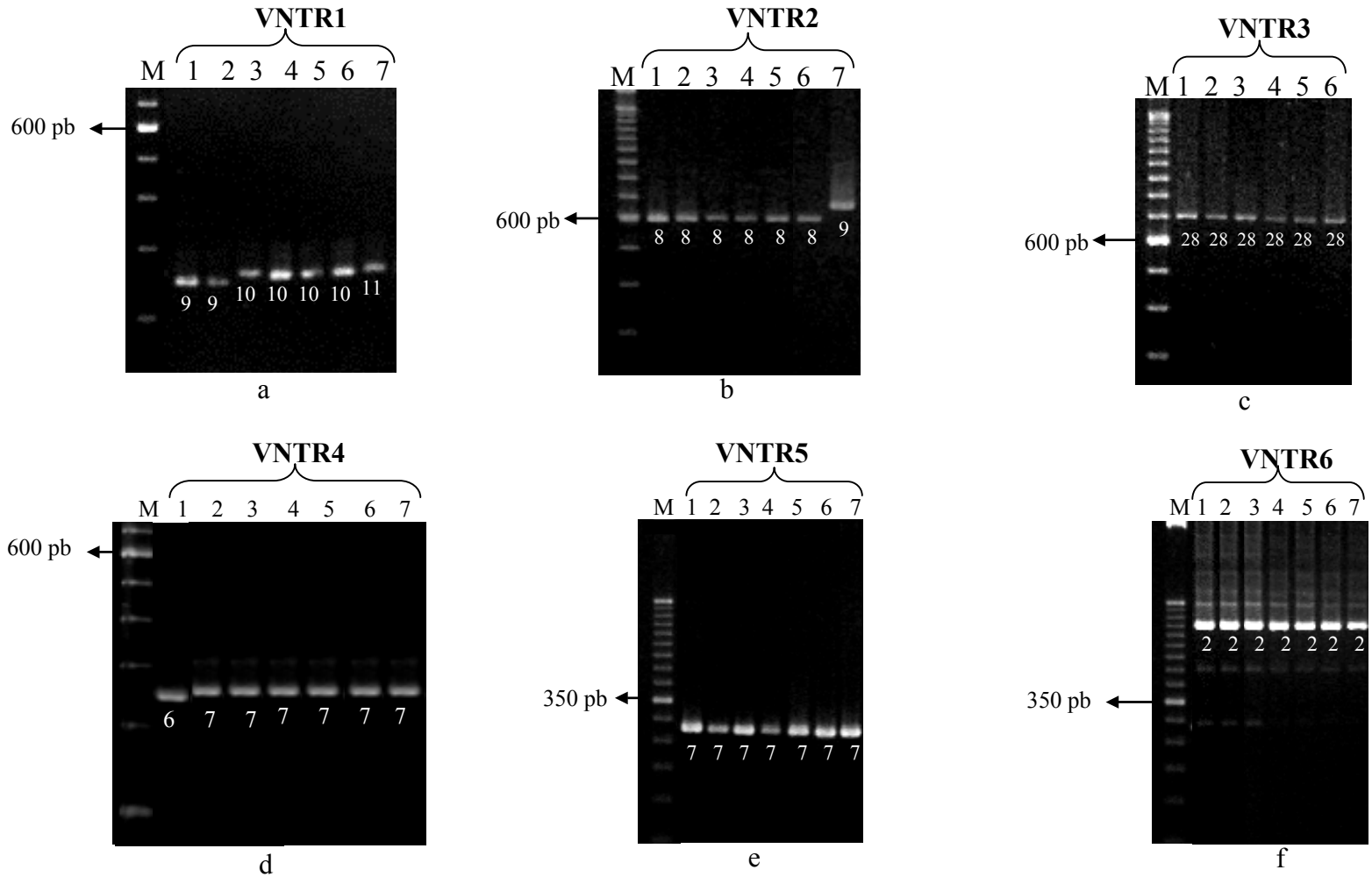


Fig. 1 (a)-(f) Gel de agarose 2,5% representativo das amplificações por PCR dos VNTRs. **1a** - Linhas: 1: P. PB 868, 2: P. PB 869, 3: P. PB 864, 4: P. PB 866, 5: P. PB 871, 6: P. PB 867, 7: P. PB 862. **1b** – Linhas: 1: P. PB 870, 2: P. PB 879, 3: P. PB 873, 4: P. PB 874, 5: P. PB 872, 6: P. PB 863, 7: P. PB 866. **1c** – Linhas: 1: P. PB 817, 2: P. PB 843, 3: P. PB 864, 4: P. PB 867, 5: P. PB 873, 6: P. PB 878. **1d –** Linhas 1: P. PB 866, 2: P. PB 872, 3: P. PB 874, 4: P. PB 862, 5: P. PB 877, 6: P. PB 881, 7: P. PB 879. **1e** - Linhas: 1: P. PB 860, 2: P. PB 865, 3: P. PB 868, 4: P. PB 870, 5: P. PB 873, 6: P. PB 851, 7: P. PB 820. **1f –** Linhas: 1. P. PB 843, 2: P. PB 860, 3: P. PB 863, 4: P. PB 873, 5: P. PB 877, 6: P. PB 881, 7: P. PB 880. **M**: "50 ou 100 pb DNA ladder".

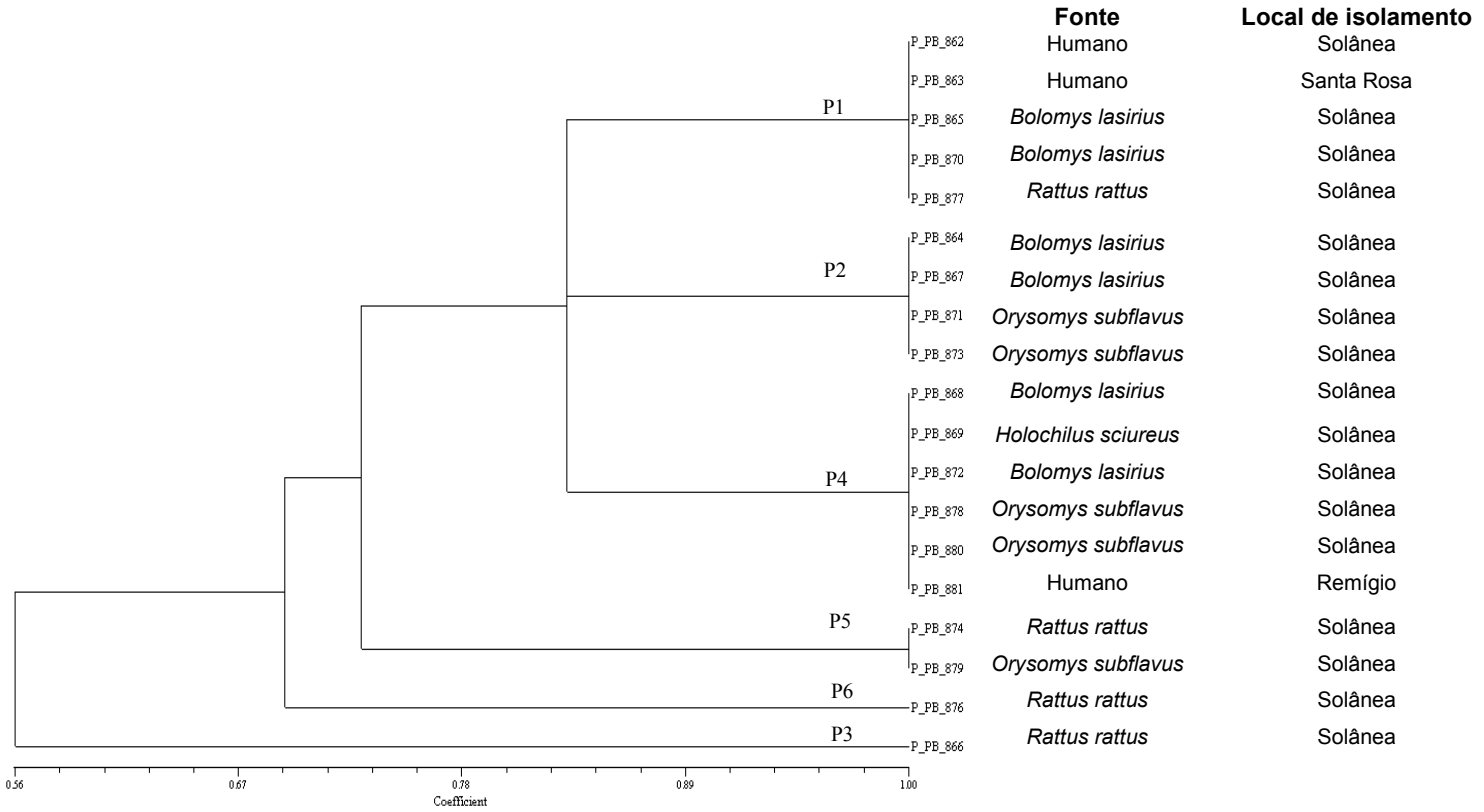


Fig. 2 Dendrograma construído baseado na análise de cepas de *Y. pestis* isoladas do surto de peste na Paraíba

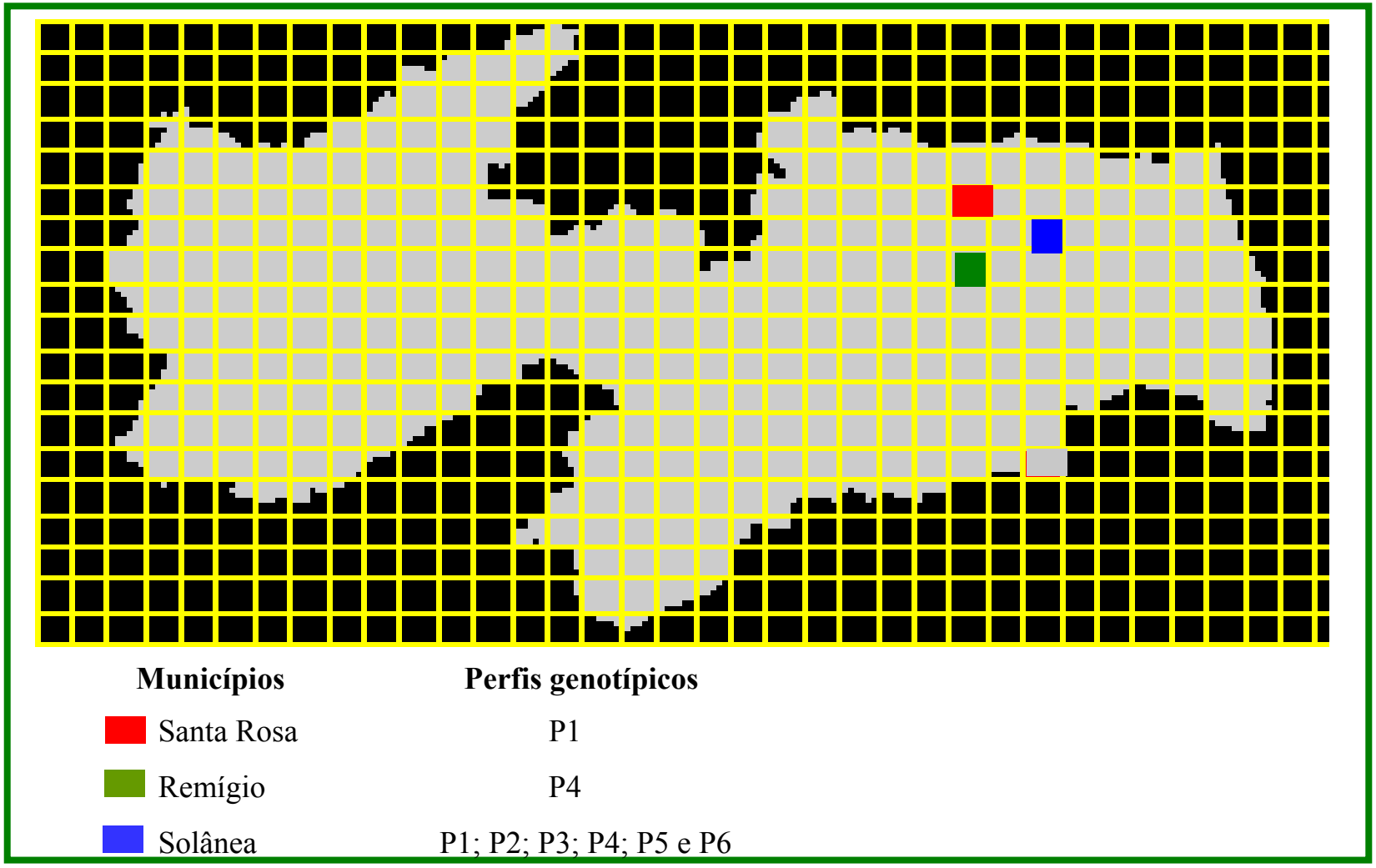


Fig. 3 Mapa do estado da Paraíba destacando os três municípios estudados e os perfis genotípicos encontrados em cada município

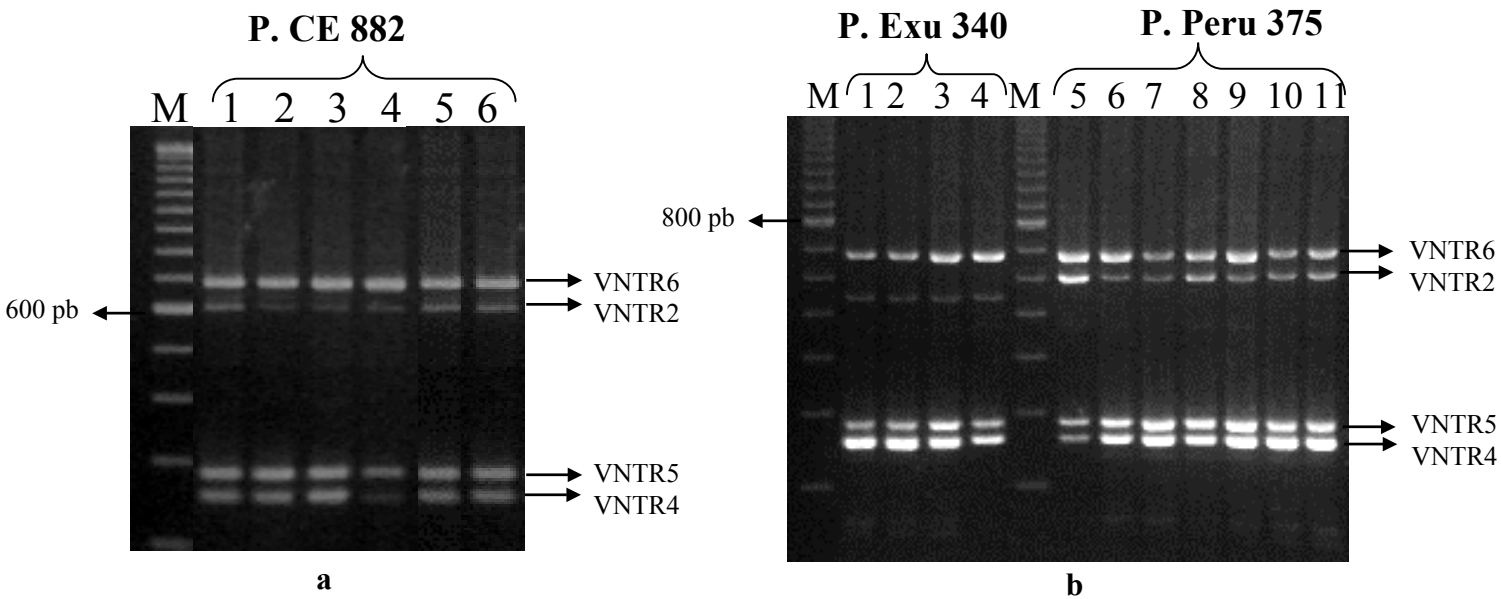


Fig. 4 (a)-(c) Gel de agarose 2,5% das cepas P. CE 882, P. EXU 340 e P. PERU 375 e suas culturas derivadas analisadas com os VNTRs: 2, 4, 5 e 6. 4a – Linhas: 1: P. CE 882, 2: YP 882/1R, 3: YP 882/4R, 4: YP 882/18R, 5: YP 882/22R, 6: YP 882/32R. 4b – Linhas: 1: P. EXU 340, 2: YP 340/10R, 3: YP 340/12R, 4: YP. EXU 340/15R, 5: P. Peru 375, 6: YP 375/1R, 7: YP 375/4R, 8: YP 375/10R, 9: YP 375/10R, 10: YP 375/16R, 11: YP 375/22R. M: "100 pb DNA ladder".

ARTIGO IV

The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*

Tereza Cristina Leal-Balbino[1], Nilma Cintra Leal[1], Mirna Gisele Medeiros do Nascimento[1], **Maria Betânia Melo de Oliveira[1],** Valdir Queiroz Balbino[2] and Alzira Maria Paiva de Almeida[1]

[1]Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, Recife, PE, Brasil.
[2]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, PE, Brasil.

E-mail do autor de correspondência: cristina@cpqam.fiocruz.br

Palavras chave: *Y. pestis,* ilha de patogenicidade, *pgm*, *psn.*

Artigo aceito para publicação na revista Genetics and Molecular Biology

Genetics and Molecular Biology, 29, 1, xxx-xxx (2006)
Copyright by the Brazilian Society of Genetics. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Research Article

Ref. Maniatis T (1989): falta pp.

The *pgm* locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*

Tereza Cristina Leal-Balbino[1], Nilma Cintra Leal[1], Mirna Gisele Medeiros do Nascimento[1], Maria Betânia Melo de Oliveira[1], Valdir de Queiroz Balbino[2] and Alzira Maria Paiva de Almeida[1]

[1]*Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, Recife, PE, Brazil.*
[2]*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, PE, Brazil.*

Abstract

The pigmentation (*pgm*) locus is a large unstable area of the *Yersinia pestis* chromosome composed of a segment of iron acquisition (HPI) linked to a pigmentation segment. In this work we examined the mobility of HPI and the pigmentation segment in three *Y. pestis* isolates using successive subcultures on Congo red agar (CRA) plates. Strain P. CE 882 was shown to be highly stable while strains P. Exu 340 and P. Peru 375 dissociated into several phenotypes, PCR analysis showing evidence of changes in the *pgm* locus of the derived cultures. Strains P. Exu 340 and P. Peru 375 produced previously unreported cultures positive for the pesticin/yersiniabactin outer membrane receptor (*psn*+) but negative for the iron-regulated protein (*irp2*-), suggesting the occurrence of rearrangements in this chromosomal region and either a sequential loss or the loss of separated segments. These results provide evidence that besides deletion *en bloc*, specific rearrangements are also involved in the deletion events for that locus.

Key words: *Y. pestis*, high pathogenicity island, *pgm, psn*.

Received: Accepted:

Introduction

The genus *Yersinia* (*Enterobacteriaceae*) contains 11 species, three of which, *pestis* (causing bubonic plague) and the enteropathogens *pseudotuberculosis* and *enterocolitica*, are pathogenic in humans (Perry and Fetherston, 1997), with plague strains as well as *enterocolitica* biotype 1B and *pseudotuberculosis* serogroups I and III also being highly pathogenic in mice (Carniel, 2001). All pathogenic strains of *Yersinia* carry the conserved 70-kb plasmid associated with *Yersinia* virulence (pYV) which is essential for virulence, with *Y. pestis* also harboring two other plasmids (pFra and pPst) that are necessary for the expression of complete virulence in this organism (Perry and Fetherston, 1997).

The chromosome of highly pathogenic yersiniae contains a region involved in siderophore-mediated iron acquisition, which is considered a high-pathogenicity island (HPI) (Carniel, 2001). The *Y. pestis* HPI is located in a large unstable area of chromosomal DNA (102-kb) first identified by Fetherston *et al*. (1992) and named the pigmentation locus (*pgm*). This area is composed of a ~35 kb iron acquisition segment (the HPI) linked to a ~68 kb pigmentation segment (Buchrieser *et al*., 1998). In the *Y. pestis* iron acquisition segment there is a cluster of genes formed by the iron-regulated protein (*irp*), yersiniabactin siderophore biosynthetic protein (*ybt*) and the pesticin/yersiniabactin outer membrane receptor (*psn*) cluster (called the *psn* cluster in *Y. pestis* or the pesticin/yersiniabactin receptor protein (*fyuA*) cluster in *Y. enterocolitica*) which is involved in the biosynthesis of the yersiniae-siderophore (yersiniabactin or Ybt). Besides having two different names (*psn* and *fyuA*), this gene cluster has dual functions in that it encodes for both the pesticin bacteriocin receptor and Ybt (Carniel, 2001; Rakin *et al*., 1994, 1996). The hemin storage (*hms*) locus is located in the pigmentation segment and is responsible for the Congo red binding pigmented phenotype (pgm+) of colonies grown on Congo red-agar plates (CRA) (Buchrieser *et al*., 1998; Fetherston *et al*., 1992, 1994; Pendrak and Perry, 1993).

In *Y. pestis,* the iron acquisition and transport systems are also under the regulation of a ferric uptake regulation (Fur) protein encoded by the *fur* gene located in another area of the chromosome outside the iron acquisition segment (Staggs and Perry, 1992).

Two copies of the insertion sequence (IS) IS*100* flank the 102-kb region of *Y. pestis.* Homologous recombination between two IS*100* sequences leads to the deletion of the

Send correspondence to Tereza Cristina Leal-Balbino. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, Campus da Universidade Federal de Pernambuco s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil. E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br.

segment responsible for the pigmentation (Pgm-) phenotype (Fetherston *et al*., 1992). Pgm- cultures are avirulent in mice inoculated via the peripheral route, except when coadministered with iron (Fetherston *et al*., 1992; Jackson and Burrows, 1956). These deletions were believed to occur *en bloc*. However, the existence of Pgm- *irp*2+ cultures (Iteman *et al*., 1993) suggests that the pigmentation segment is mobile and independent of the iron acquisition segment. Buchrieser *et al*. (1998) identified several rearrangements involved in different phenotypes of colonies developed on CRA plates from cultures of different geographical origin.

The aim of the work described in this paper was to determine the mobility of HPI and the pigmentation segment in *Y. pestis* isolates through successive subcultures on CRA plates and using PCR for the determination of the genes from the two segments of the pigmentation locus and *fur*.

Material and Methods

Bacterial isolates and culture conditions

The study involved three *Y. pestis* isolates: an early isolate (P. Exu 340) derived from the bone marrow of a finger from a fatal human case of plague in 1969; a more recent Brazilian isolate (P. CE 882) derived from a blood culture from a plague case in 1997 in the Brazilian state of Ceará; and a 1994 isolate (P. Peru 375) from a Peruvian plague patient. The Girard-Robic EV76 vaccinal strain served as the pigmentation phenotype control. These strains are held at the culture collection of the Department of Microbiology, CPqAM (Leal-Balbino *et al*., 2004). For this work, the parent cultures were reactivated by growing them at 28 °C in brain heart infusion (BHI) broth, (Difco, USA) for 24 h and then plating on blood agar base (BAB; Difco, USA) for 48 h.

After reactivation, the cultures were submitted to successive subculturing on Congo red agar (CRA) plates incubated at 26 °C for 4 days (Surgalla *et al*., 1970) for phenotypic observation. There were five different types of colonies: red (R), white (W), half red/half white (RW), red with a thin white border (RWB) and white with a red pin-point center (WRP). Phenotypically selected colonies from the CRA plates were grown in brain heart infusion (BHI) broth and their genomic DNA extracted according to Maniatis *et al*. (1989) for PCR assay.

The number of subcultures and colonies analyzed varied for each parent culture, the derivative strains were allocated a strain number commencing with YP (for *Y. pestis*) followed by the parent strain number, subculture number and phenotype (Figure 1).

PCR analysis

Parent and derivative cultures of strains P. CE 882, P. Exu 340 and P. Peru 375 were analyzed for the presence of genes from the iron acquisition (*psn*, *ybtE, irp2*) and the pigmentation segments (*hms*H) and PCR with primers derived from published sequences (Rakin and Heeseman, 1995; Buchrieser *et al.* 1999; Guilvout *et al.* 1993; Schubert *et al.* 1998).

To further understand the events involved in the modifications of the *pgm* locus, the presence of the *ansP* gene, located in the central area of this locus (between the iron ac-

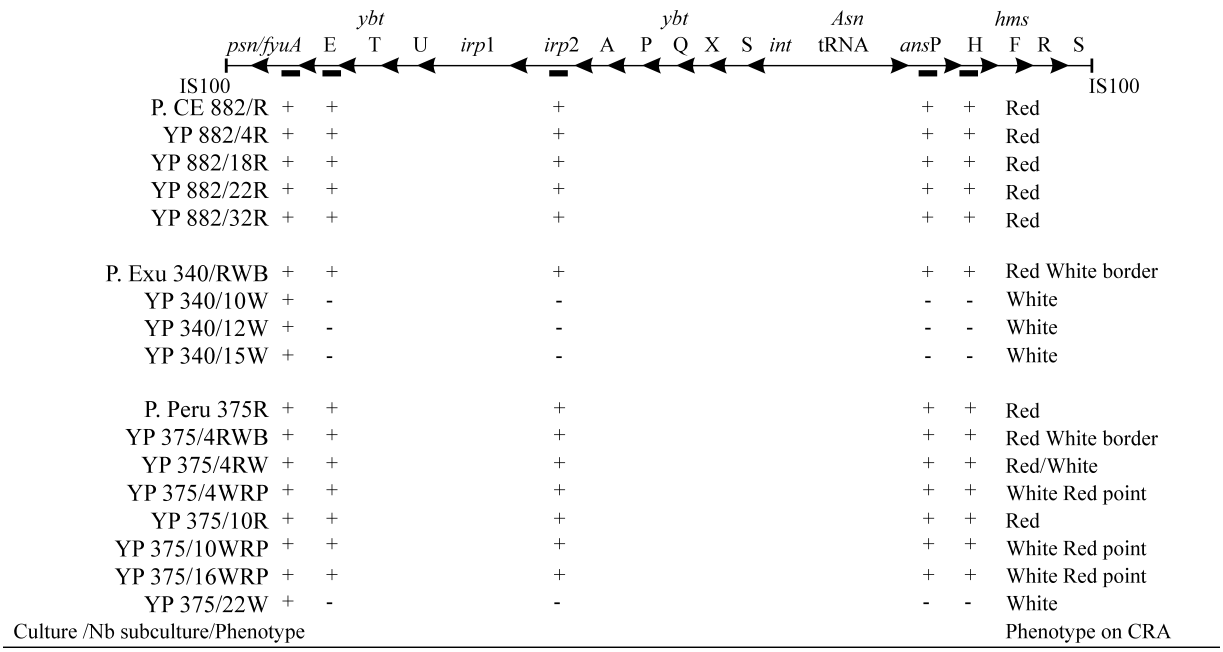


Figure 1 - Schematic representation of the *pgm* locus of *Yersinia pestis* showing the results of PCR amplification of segments located in the high-pathogenicity island (HPI) and in the pigmentation segment of the different strains. The bars below the *pgm* locus represent the targeted genes. (+) = presence of the amplified DNA segment; (-) = no amplified segment.

quisition and the pigmentation segments), was investigated with specific PCR primers obtained using the 'PrimerSelect' program (DNAstar, Inc.).

The role of Fur in the different phenotypes obtained on CRA plates from the parent cultures was examined by determining the presence of the *fur* gene by PCR using primers derived from the published sequence of this gene (Hinnebush *et al.* 1998).

The PCR reactions for *psn*, *ybtE, irp2, hms*H, *fur* and L-asparagine permease (*ansP*) genes, consisted of 20 ng of strain DNA, 1U of *Taq* DNA polymerase (CENBIOT, BR), 160 μM of each dNTP (Amersham Biosciences of Brazil Ltda, BR), 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pmol of each primer, 50 mM KCl and 10 mM Tris-HCl-pH 8 in a final volume of 25 μL. Amplifications were performed in a thermocycler (Perkin Elmer, USA) programmed for 25 cycles of 1 min at 94 °C, 2 min at the annealing temperatures (Tm) and 3 min at 72 °C, finishing with a final elongation step of 7 min at 72 °C. The sequences of the forward primer (FP), reverse primer (RP) and the sizes and Tm of the expected segments (S) are shown in Table 1. The annealing regions of the primers on the targeted genes (*pgm* locus) were confirmed using the 'PrimerSelect' program.

Construction of the HmsH probe and hybridisation

The presence of the pigmentation segment was determined in the RWB and WRP phenotypes by amplification of the *hms*H gene and the three phenotypes (R, RWB and WRP) were compared with regard to this genomic region. Total DNA of the parent strains (P. Exu 340, P. CE 882 and P. Peru 375) and derived cultures was digested with the *Dra*I and *Ava*I restriction enzymes and hybridized with a probe directed to the *hms*H gene.

The HmsH probe was obtained by PCR and labeled during the amplification reaction using the DIG-dNTP DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim, DE) following the manufacturer's instructions.

Based on the restriction map of the *hms*H gene obtained with the 'PrimerSelect' program we chose *Dra*I and *Ava*I to digest the total DNA extracted from the *Y. pestis* cultures. The restriction fragments were separated by electrophoresis, transferred by vacuum to nylon membranes using the VacuGeneTMXL (Amersham Biosciences of Brazil Ltda, BR) system and hybridized with the HmsH probe. Pre-hybridization (for 30 min) and overnight hybridization were performed at 65 °C in a hybridization oven (Cole-Parmer, USA) following the protocol provided with the kit (Amersham Biosciences of Brazil Ltda, BR).

Analysis of the *psn* gene sequence

To confirm that the segment amplified by PCR was really part of the *psn* gene, the amplified *psn* segments of the *Y. pestis* cultures were eluted from the gel, purified using the Concert Nucleic Acid Purification Kit (Gibco, USA) and analyzed in an ABI 310 automatic sequencer (Applied Biosystems, USA). The nucleotide sequences obtained were analyzed with the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al*., 1997).

To compare the segments of the *psn* gene amplified from the different cultures, the PCR products were digested with *Eco*RV and *Bcl*I and the fragments separated by agarose gel electrophoresis.

Nucleotide sequence accession number

The Genbank accession number for the sequence of the *psn* gene of strain YP 340/15W is AY461411.

Results and Discussion

Pigmentation analysis of the colonies grown on CRA plates revealed important differences among the three isolates studied. Strain P. CE 882 has proved to be highly stable, since its isolation in 1997 (Leal and Almeida, 1999) it has produced only red (R or Pgm+) colonies on CRA plates and no phenotypic alteration has been detected through 32 subcultures (Figure 1).

Strain P. Exu 340 was found to be unstable because when it was obtained in 1969 and first analyzed it was Pgm+ but developed red colonies with a thin white border (RWB). After 10 subcultures of the RWB colonies only white (W or Pgm-) colonies were produced on CRA plates (Figure 1).

Strain P. Peru 375 also proved to be unstable, with its initially red colonies producing five different types of subculture colonies (R, W, RW and WRP). After the 22nd subculture from RWB or WRP, completely white colonies were observed (Figure 1).

Table 1 - Primers used in the PCR analysis.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
irp2	5'-ATTTCTGGCGCACCATCT-3'	5'-GCGCCGGGTATTACGGACTTC-3'	1000	50
hmsH	5'-TAAAGAAAGACCCCACCAATC-3'	5'-ATCATCGGCATCAAGCAAATC-3'	730	55
ansP	5'-GCCGCTATTGCCCTGTTTTTGAT-3'	5'-ACCGGGCATTTTGAAGGAGACAG-3'	730	50
ybtE	5' - CCCTTACCCATTGCCGAAC-3'	5'-TCCCCACCTCATCCAGCC-3'	1200	50
fur	5'-GAAGTGTTGCAAAATCCTGCG-3'	5'-AGTGACCGTATAAATACAGGC-3'	328	65
psn	5'-CAACATCGTCACCCAGCA-3'	5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3'	920	65

PCR using primers directed to genes of both segments of the *pgm* locus resulted in amplification of all the expected DNA segments of the correct sizes corresponding to the genes *irp2* (1000 bp), *ybtE* (1200 bp) and *hms*H (730 bp) in the parent strain P. CE 882 and its derivative cultures (Figures 1, 2B-D). There was also amplification of all the targeted genes of strain P. Exu 340 (RWB) and of the different P. Peru 375 phenotypes (R, RWB and WRP) analyzed. These genes were not amplified in the white cultures derived from strains P. Exu 340 and P. Peru 375 (Figure 1).

A segment of the expected size (730 bp) for the *ansP* gene was amplified in the parent strain P. CE 882 (R) and in the four (Pgm+) derivative cultures analyzed after the 4th, 18th, 22nd and 32nd subcultures (Figures 1, 2A). This segment was also amplified in cultures of P. Exu 340 (RWB), P. Peru 375 (R) and in the phenotypes RWB and WRP, analyzed after the 4th, 10th or 16th subcultures from P. Peru 375. However, there was no amplification in the three white cultures obtained (YP 340/10W, YP 340/12W, YP 340/15W), respectively from the 10th, 12th, and 15th subcultures of P. Exu 340 and from the white culture (YP 375/22W) obtained from the 22nd subculture of P. Peru 375 (Figure 1). These results suggest that the central region of the *pgm* locus is complete in the R, RWB and WRP phenotypes and is deleted in the W phenotype.

The PCR analysis showed that the *pgm* locus is similar in the R, RWB and WRP phenotypes. However, the HmsH probe only recognized the R and RWB phenotypes and the hybridization profiles obtained in the two phenotypes were identical (Figure 3). Despite the phenotypic difference, no alteration was detected in the *pgm* locus of the R and RWB isolates using either PCR or hybridization with the probe. The WRP phenotype was not recognized by the probe in spite of PCR amplification of the *hms*H gene. This phenotype is probably composed of a mixed population, where the number of Pgm+ cells is too small and the target is not detected by hybridization, although efficiently amplified by PCR.

The amplification product of the expected size for the *fur* gene (328 bp) was obtained in all the parent and derivative cultures studied, independent of whether the phenotype was R, RWB, WRP or W, suggesting that the phenotypic modifications are not related to this gene (Figure 4).

Amplification of a segment of the expected size (920 bp) for the *psn* gene was observed in all cultures of strains P. CE 882, P. Exu 340, P. Peru 375 and derivative cultures, independent of their phenotype on CRA plates. Unexpectedly, this segment was also amplified in the white cultures (W) derived from strains P. Exu 340 and P. Peru 375,

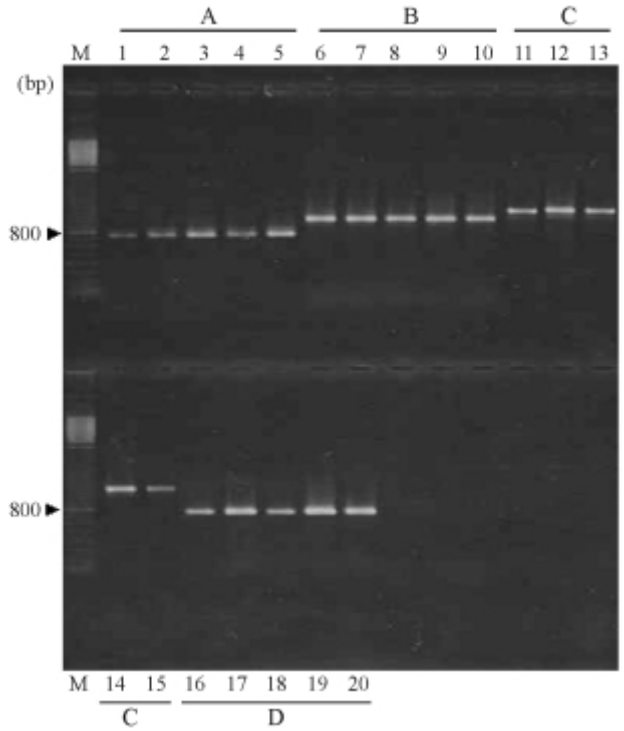


Figure 2 - PCR products from primers directed to the genes: *ansp* (A); *irp2* (B); *ybt*E (C) and *hms*H (D) and the strains P. CE 882R (lines 1, 6, 11, 16); YP 882/4R (lines 2, 7, 12, 17); YP 882/18R (lines 3, 8, 13, 18); YP 882/22R (lines 4, 9, 14, 19); and YP 882/32R (lines 5, 10, 15, 20); M = 100 bp DNA ladder.

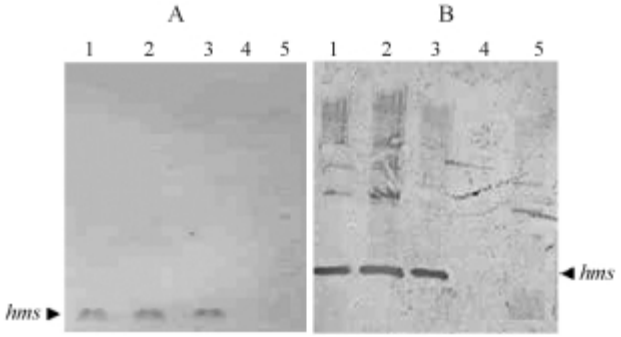


Figure 3 - Hybridization with the HmsH probe and DNA from strain P. CE 882R as positive control (lines 1); P. Exu 340/RWB (line 2); YP 375/4RWB (line 3); YP 375/16WRP (line 4); and YP 375/22W (line 5), digested with *Dra*I (A) and *Ava*I (B).

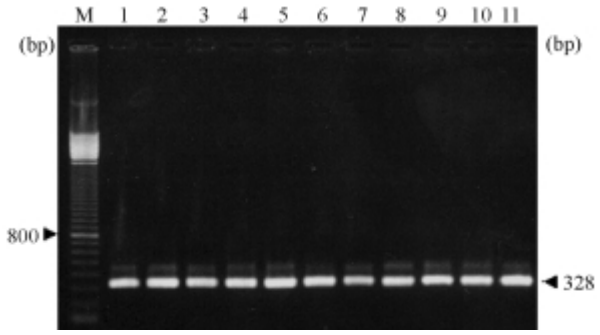


Figure 4 - PCR products from primers directed to the *fur* gene and strains P. CE 882R (strain 1); YP 882/32R (line 2); P. Exu 340/RWB (line 3); YP 340/10W (line 4); YP 340/15W (line 5); P. Peru 375R (line 6); YP 375/4RW (line 7); YP 375/4RWB (line 8); YP 375/4WRP (line 9); YP 375/16WRP: (line 10); YP 375/22W (line 11); M = 100 bp DNA ladder.

in spite of the absence of the *irp*2, *ybt*E, *ans*P and *hms*H genes in these cultures (Figures 1, 5A).

Analysis of the results with the BLAST program revealed high homology between the *psn* gene of *Y. pestis* and the *fyu*A of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* and we also observed that the deduced sequence of the protein was similar to that of the FyuA protein of *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* and *E. coli*. These results confirm the presence of the *psn* gene in the *irp2*- Pgm- *Y. pestis* cultures

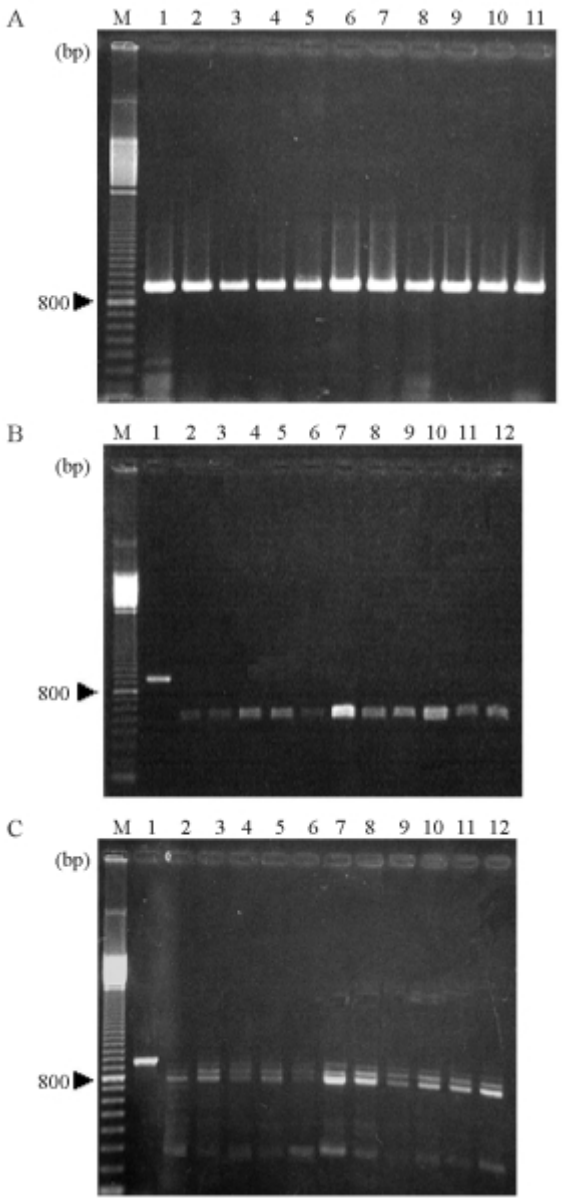


Figure 5 - PCR products from the primers directed to the gene *psn* (A) and strains P. CE 882R (line 1); YP 882/32R (line 2); P. Exu 340/RWB (line 3); YP 340/10W (line 4); YP 340/15W (line 5); P. Peru 375R (line 6); YP 375/4RW (line 7); YP 375/4RWB (line 8); YP 375/4WRP (line 9); YP 375/16WRP (line 10); YP 375/22W (line 11); M = 100 bp DNA ladder; and digestion of the PCR products with *Bcl*I (B) and *EcoR*V (C): same cultures lines 2-12; undigested PCR from YP 882/32R: line 1; M = 100 bp DNA ladder.

analyzed, and they also demonstrate high homology for the *psn* gene among yersiniae.

Comparison of agarose gel electrophoresis bands of the segments of the *psn* gene amplified in the different cultures and digested with *Bcl*I and *Eco*RV revealed an identical restriction pattern in all the cultures (Figure 5B-C).

It has been reported that in *Y. enterocolitica* deletion of the *fyu*A *irp2* genes occurs only in the *fyu*A part of the gene cluster. Three different types of cultures (*fyu*A+ *irp2+, fyu*A- *irp2*- and *fyu*A- *irp2+*) were observed in *Y. enterocolitica* by Rakin *et al*. (1994) but the *psn* + *irp2*- isolate found among the *Y. pestis* strains in the present study has not been previously described.

The *irp1, irp2, fyu*A fragment is unstable in *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. Lesic *et al.* (2004) showed that the excision of HPI in *Y. pseudotuberculosis* requires the combined actions of an integrase and a recombination directionality factor. In *Y. enterocolitica*, this instability is due to IS1328 or other insertion elements adjacent to *fyu*A (Fetherston *et al*., 1992; Rakin and Heeseman, 1995). The deletion may involve the *fyu*A gene only or both *fyu*A and *irp2* (Rakin and Heeseman, 1995).

The finding of *psn* + *irp*2- cultures suggests the occurrence of rearrangements in this region and a sequential loss or the loss of separated segments. These events are also probably due to the presence of repetitive sequences (RS4 and RS5) or of insertion sequences (IS100) flanking the *Y. pestis* HPI (Fetherston *et al*., 1992; Buchrieser *et al*., 1998).

Our results suggest that the alteration of the 102-kb region of *Y. pestis* involves not only deletion en bloc by homologue recombination between IS100 sequences flanking the region but also other specific rearrangements in this segment.

Acknowledgments

We thank Dr Osvaldo Pompílio (CPqAM/FIOCRUZ) for advice during the work. We are grateful to Silvana Santos and Yara Nakasawa for their technical assistance and the Brazilian Research Council Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402.

Buchrieser C, Prentice M and Carniel E (1998) The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. J Bacteriol 180:2321-2329.

Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, Couve E, Billault A, Kunst F, Carniel E and Glaser P (1999) The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: Sequence analysis and comparison of

selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Infect Immun 67:4851-61.

Carniel E (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: An iron-uptake island. Microbiol Infect 3:561-569.

Fetherston JD, Schuetze P and Perry RD (1992) Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. Mol Microbiol 6:2693-2704.

Fetherston JD and Perry RD (1994) The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensivity and HMWP2. Mol Microbiol 3:697-708.

Guilvout I, Mercereau-Puijalon O, Bonnefoy S, Pugsley AP and Carniel E (1993) High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. J Bacteriol 175:5488-5504.

Hinnebusch BJ, Gage KL and Schwan TG (1998) Estimation of vector infectivity rates for plague by means of a standard curve-based competitive polymerase chain reaction method to quantify *Yersinia pestis* in fleas. Am J Trop Med Hyg 58:562-569.

Iteman I, Guiyoule A, Almeida AMP, Guilvout I, Baranton G and Carniel E (1993) Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated *irp2* gene in *Yersinia pestis* evidence for separate but related events. Infect Immun 61:2717-2722.

Jackson S and Burrows TW (1956) The virulence enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. Brit J Exp Pathol 37:577-583.

Leal-Balbino TC, Leal NC, Lopes CV and Almeida AM (2004) Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures *in vitro*: Impact on virulence. Mem Inst Oswaldo Cruz 99:727-732.

Leal NC and Almeida AMP (1999) Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. Rev Inst Med Trop São Paulo 41:339-342.

Lesic B, Bach S, Ghigo J-M, Dobrindt U, Hacker J and Carniel E (2004) Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of this cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. Mol Microbiol 52:1337-1348.

Maniatis T, Frisch E and Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Pendrak ML and Perry RD (1993) Proteins essential for expression of the Hms+ phenotype of *Yersinia pestis*. Mol Microbiol 8:857-864.

Perry RD and Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 10:35-66.

Rakin A, Saken E, Harmsen D and Heeseman J (1994) The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica:* A novel virulence factor with dual function. Mol Microbiol 13:253-263.

Rakin A and Heeseman J (1995) Virulence-associated *fyuA/irp2* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* biotype 1B carries a novel insertion sequence IS1328. FEMS Microbiol Lett 129:287-292.

Rakin A, Boolgakowa E and Heeseman J (1996) Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster. Microbiology 142:3415-3424.

Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E and Heesemann J (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect Immun 66:480-5.

Staggs TM and Perry RD (1992) Fur regulation in *Yersinia* species. Mol Microbiol 6:2507-2516.

Surgalla MJ, Beesley ED and Albizo JM (1970) Pratical applications of new laboratory methods for plague investigations. Wld Hlth Org Bull 42:993-997.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados com as análises dos locos *pgm* e VNTR, conclui-se que:

1) As análises em três cepas de *Y. pestis* não relacionadas epidemiologicamente (duas brasileiras e uma de outro foco sul-americano) submetidas a manipulações "in vitro" revelaram diferenças na estabilidade do loco pgm das cepas. Um novo genótipo positivo para o receptor da pesticina/yersiniabactina (psn+) e negativo para o gene irp2 (irp2-) foi identificado sugerindo a ocorrência de rearranjos no loco pgm, uma perda seqüencial ou a perda de um dos segmentos desse loco evidenciando que além da deleção em bloco, arranjos específicos estão também envolvidos na deleção desse loco.

2) As análises dos VNTRs (MLVA-PCR) em cepas de *Y. pestis* isoladas de humanos, roedores e pulgas de diversos focos pestosos brasileiros em diferentes períodos revelaram grande heterogeneidade tendo sido identificados vários perfis genotípicos.

3) Alguns perfis apresentaram uma ampla distribuição sendo encontrados em cepas originadas dos diversos focos brasileiros e de outros países analisadas, enquanto que outros foram restritos a um determinado foco.

4) Esta heterogeneidade também foi encontrada em cepas de *Y. pestis* epidemiologicamente relacionadas evidenciando a circulação de populações distintas da bactéria em uma área de foco durante um surto.

5) A estabilidade dos VNTRs nas culturas submetidas a manipulações "in vitro" indica que a diversidade dos genótipos encontrados nas cepas epidemiologicamente relacionadas ou não relacionadas, refletem as modificações na natureza e não resultaram de alterações durante a estocagem e manipulações no laboratório.

6) O MLVA-PCR revelou diversidade genética entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* apesar da similaridade entre essas espécies.

7) Foi encontrado menor polimorfismo nos VNTRs analisados das cepas de *Y. enterocolitica* do que nas espécies mais homogêneas *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis.*

ANEXOS

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISSN 0074-0276
printed version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and policy

The **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** is a multidisciplinary journal which publishes original research throughout the fields of tropical medicine (including pathology, field epidemiology and clinical studies) medical and veterinary parasitology (including protozoology, helminthology, entomology and malacology), and medical microbiology (virology, bacteriology and mycology). It particularly welcomes basic and applied research in biochemistry, immunology, molecular and cell biology, physiology, pharmacology and genetics related to these fields. Short communications are also considered. Review articles are invited. The journal publishes eight issues constituting one volume per year. Occasionally papers presented at symposia or congresses are published as supplements. Submitted papers must be written in Portuguese or English. English of low quality is a major cause of delay in publication and we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist.

Submission of a paper to the **Memórias** is understood to imply that is has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Manuscripts will be peer-reviewed; acceptance will be based on scientific content and presentation of the material.

All material should be sent to the Editorial Office, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365,

Pavilhão Mourisco sala 308, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Manuscripts that are not in accordance with these instructions will be immediately returned to authors.

Manuscripts and figures should be sent in quadruplicate (including photographs) together with a diskette containing the text (including tables, graphics and digitalized photographs) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted). **Each manuscript should be accompanied by a covering letter, signed by all authors, containing the full address of the author who will deal with correspondence, his e-mail and fax number.**

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if accepted for publication, copyright of the article, including the right to reproduce the article in all form and media, shall be assigned exclusively to the **Memórias**. The journal will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce any contribution.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the **Memórias** or consult the home-page of the **Memórias** (http://memorias.ioc.fiocruz.br/), or contact the Editorial Office by phone (+55-21-2598.4335), Telefax (+55-21-2280.5048 / 2561.1442), or e-mails (E-mails: memorias@fiocruz.br/ memorias@ioc.fiocruz.br)

Format style

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm.

The manuscript should be arranged in the following order: running title, title, authors' names, institutional affiliations, summary, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, and references. Sponsorships and corresponding author (mentioning fax number and e-mail address) should be as a footnote on the first page.

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult www.nlm.nih.gov/serials/lii.html.

- In the text use authors' surname and date:
Lutz (1910) or (Lutz 1910).

With two authors it is
(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912).

When there are more than two authors, only the first is mentioned:
Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- At the end of the paper use the following styles:

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

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

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

Illustrations: Figures and tables must be understandable without reference to the text.

- Figures should be mounted on a manuscript-size sheet. Photographs must be sharply focused, well contrasted, black and white glossy prints. Photographs and line drawings must be marked on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. If mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Legends must be provided on a separate sheet. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. Collour illustrations can only be accepted if the authors defray the cost. However, a colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover at no charge.

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Short communications should communicate rapidly

single results or techniques. They should occupy no more than four printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

• a diskette containing the text of the final approved version of the manuscript (including tables and graphics) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted);

• an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;

• a copyright assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Offprints: authors will receive 30 free offprints. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

Checklist for manuscripts to be submitted

Please check every item below before submitting your

manuscript to **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

• Please provide a cover letter, **signed by all authors**, with your submission specifying the corresponding author as well as an address, telephone and facsimile number, and e-mail.
• Submit four printed copies of your manuscript, each with a complete set of original illustrations, and a diskette containing the text, tables, graphics and digitalized photographs.
• The entire manuscript (including tables and references) must be typed double-spaced, font size 12, and printed on standard-sized paper. The left and right margins must be at least 3 cm.
• Please number pages beginning with the title page.
• The title page must include a running headline of not more than 40 characters, a title of no more than three printed lines (250 letters and spaces), authors (no titles or degrees), institutional affiliations, complete address of author to whom correspondence must be addressed, and footnotes indicating sources of financial support and changes of address.
• The order of appearance of material in all manuscripts should be as follows: running headline, title, authors, institutional affiliations, abstract, key words, footnotes, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, tables, legends for figures, and figures.
• References must be cited on the line of the text and in parentheses, e.g., (Chagas 1909). References not cited in the text cannot appear in the reference section. Reference citations must follow the format established by the "Index" (see examples in Format style).
• If you reference your own unpublished work (i.e., an "in press" article) you must enclose an acceptance letter from the journal.
• If you cite unpublished data that are not your own, you must provide a letter of permission from the author of that publication.
• Please provide three glossy or laser-produced prints of each figure. Label all figures with the first author's name and figure number (place typed label on back of figure). Provide a figure legend for each figure on a separate page at the end of the manuscript.
• Tables must be on a separate page at the end of the manuscript. A short descriptive title must be provided for each table.

© 1997-2005 Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335
Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442

LETTERS IN appliedmicrobiology

Letters in Applied Microbiology

Part of Journal of Applied Microbiology, the Official Journal of the Society for Applied Microbiology

Published on behalf of the Society for Applied Microbiology

Edited by:
J.-Y. Maillard

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2004: 62/133 (Biotechnology & Applied Microbiology); 56/84 (Microbiology)
Impact Factor: 1.461

Author Guidelines
Did you know... *Letters in Applied Microbiology* has no page charges?

Please note that these author guidelines have been updated recently. It is recommended that all authors check the guidelines thoroughly even if they have previously submitted an article to this journal.
...Quick Links...
Manuscript submission:
http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/
Editorial Office:
lam@oxon.blackwellpublishing.com
Production Office:
lam-proofs@oxon.blackwellpublishing.com
Electronic Graphics:
http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp
Exclusive Licence form:
http://www.blackwellpublishing.com/pdf/lam_caf.pdf
Colourwork Agreement form:
http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf
The preparation and presentation of manuscripts
Page charges are only incurred with respect to pages requiring colour printing (see below). Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in *Letters* is at a premium, individual papers have a limit of approximately 4000 words, including figures and tables (N.B. a half page figure is equivalent to 450 words). The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.
Format of papers
Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word

breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively, and should have line numbers. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off.
The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

Submissions

Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice.
Authors are advised to submit their manuscripts online at http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/ . If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant lam@oxon.blackwellpublishing.com. A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc), Rich Text Format (.rtf), Portable Document Format (.pdf) or PostScript (.ps) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

1. Full-length papers

The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.
The paper will have the following sections:
(a) ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
(b) INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
(c) MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 **96**(2):221; available at http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full);
(d) RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study;
(e) DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
(f) ACKNOWLEDGEMENTS; and

(g) REFERENCES: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

Layout of references

The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127–135.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control.* US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91–96. London: The Royal Society of Chemistry.

Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

English usage

Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

Headings

The hierarchy of the headings used is:

First Order

MATERIALS AND METHODS

Second Order

Sample preparation

Third Order

The media. First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

Abbreviations and units

The Journal uses SI units: g l-1 not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l-1 (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the *Biochemical Journal* 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas, Proteus, Pediococcus***,** etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*;

groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A).
Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae) .
The nomenclature used when describing the species of Salmonella should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (http://www.bacterio.cict.fr/). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word 'serotype' and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalized (for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should by written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm*. Typhimurium).
Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names:
Acet., Acetobacter; Ac., Acinetobacter; Act., Actinomyces; Aer., Aeromonas; Ag., Agrobacterium; Alc., Alcaligenes; Alt., Alteromonas;
B., Bacillus; Bact., Bacteroides; Bord., Bordetella; Bran., Branhamella; Br., Brucella;
Camp., Campylobacter; Cit., Citrobacter; Cl., Clostridium; Coryne., Corynebacterium; Cyt., Cytophaga;
Des., Desulfomonas or Desulfovibrio (spell out if both appear in same paper)*;*
Edw., Edwardsiella; Ent., Enterobacter or Enterococcus (spell out if both appear in same paper);
Erw., Erwinia; E., Escherichia; Eu., Eubacterium;
Fl., Flavobacterium; Fus., Fusobacterium;
G., Gemella;
H., Haemophilus;
Kl., Klebsiella; Lact., Lactobacillus;
L., Lactococcus; Leg., Legionella; Leuc., Leuconostoc; L., Listeria;
Meth., Methanobacterium or Methanococcus (spell out if both appear in same paper)*; Mic., Microbacterium; M., Micrococcus; Mor., Moraxella; Myco., Mycobacterium; Myc., Mycoplasma;*
N., Neisseria; Nit., Nitrobacter or Nitrosomonas (spell out if both appear in same paper); Noc., Nocardia;
Past., Pasteurella; Ped., Pediococcus; Ple., Plesiomonas; Pr., Proteus; Ps., Pseudomonas;
Rh., Rhizobium; R., Ruminococcus;
Salm., Salmonella; Ser., Serratia; Sh., Shigella; Staph., Staphylococcus; Strep., Streptococcus; S., Streptomyces;
T., Thiobacillus;
V., Vibrio;
X., Xanthomonas;
Y., Yersinia.
For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp
In this, many species names not included in the Approved Lists (www-sv.cict.fr/bacterio) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered.

Nucleotide sequences

(1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the

manuscript;
(2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information;
(3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, , **, †† etc. For an example of LAM table style, click here.

Figures

Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of LAM figure style, click here.

Photographs. These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

Electronic submission. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp

Colour figures. It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf. If you are unable to download the form please contact the Editorial Office.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example in vitro biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free animals* are those with an associated flora which have become conventional.

Supplementary material

Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

2. Review Articles

Preparation of manuscript

These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available. The final manuscript must not exceed 22 pages (A4) with double-spaced

typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only.

Manuscript presentation

The headings in these Review articles are of the author's choice; they should be listed under the heading 'Contents' on page 2 of the manuscript. A short SUMMARY of 150-200 words must be included. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and email address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

A. The title should be as shown here. Lower case after first letter.
B. The author(s) – I.M. Able, J. Brown and A. Lincoln.
C. Address – upper and lower case.
D. List of contents, to follow title page.
  1. Summary
  2. Introduction
    2.1 .....
  3. .....
    3.1 .....
    3.2 .....
E. The manuscript
  1 SUMMARY (left flush)
  2 INTRODUCTION
  3 INFECTIONS CAUSED BY PATHOGENS
    3.1 Skin infections
    3.2 Pulmonary infections
  4 INCIDENCE
  5 TREATMENT
  6 CONCLUSIONS
  7 REFERENCES

3. Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and

conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

Exclusive licence

Papers are accepted on the understanding that *Letters* is granted exclusive licence to publish them.

OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to $2500), excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/LAM_OOF.pdf

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s)

Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

Abbreviations

These are some examples of common abbreviations used in *Letters in Applied Microbiology*:

A, Absorbance

approx. or *c.*, approximately

at. wt., atomic weight

bp, base pairs

by vol, by volume (for greater than two component liquids)

cm2, per square centimetre

cpDNA, chloroplast DNA

D, attenuance (see http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html

Da (kDa), daltons (kilodaltons)

edn, edition

ed., editor(s)

ergs. sq. mm-1, ergs per square millimetre

IU, International unit

kbp, kilobase pair

Mabs, monoclonal antibodies
MIC, minimal inhibitory concentration
mol 1-1, moles per litre
Mr,molecular mass
nm, nanometre
OD, optical density
OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis
ORF or orf, open reading frame
P, probability
PFG, pulsed field gradient
ppm, parts per million
recDNA, recombinant DNA
rev min-1, revolution per minute
SD, standard deviation
SE, standard error
subsp., subspecies
U, enzyme unit
UV, ultraviolet
vs, versus
v/v, volume per volume
w/v, weight per volume
w/w, weight per weight
There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, HPLC, RNA or SDS-PAGE.

OnlineEarly

Letters in Applied Microbiology is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service. OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: http://www.doi.org/faq.html.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive Licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/lam_caf.pdf
Colourwork Agreement form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf

ISSN 1415-4757 *printed version*
ISSN 1678-4685 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Scope and policy
- Submission of papers

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief in the address below.

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a. A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;

b. A copy of the manuscript, including original figures.
c. A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
d. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage,

or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.
Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.
Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.
Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.
Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi).

Sample journal article citation:
Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma 7:371-386.
Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Rev Bras Genet 1:103-120.

Sample book citation:
Salzano FM and Freire-Maia N (1967) Populações Brasileiras. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.
Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press.

New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:
Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) Elementos de Genética. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation:
Basile R (1973) Cromossomos Politênicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhyncosciara*. Ciênc e Cult 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation:
Frota-Pessoa O (1953) Revision of the *Tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

Sample Electronic Article citation:
Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. Plos Biol 2: 194-205. http://www.plosbiology.org.

Sample Electronic Database citation:
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the

file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.