

# Relação genética entre as cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no foco da chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil, por MLVA

Relationship analysis of *Yersinia pestis* strains isolated during the epidemic focus of Araripe, Pernambuco, Brazil, by MLVA

Morse Edson Pessoa Junior<sup>1\*</sup>, Gerlane Tavares de Souza<sup>3</sup>, Silvana Santos<sup>3</sup>, Tereza Cristina Leal Balbino<sup>3</sup>, Nilma Cintra Leal<sup>3</sup>, Maria Betânia Melo de Oliveira<sup>2</sup> e Alzira Maria Paiva de Almeida<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Contato do autor: morsejr@gmail.com

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

**Palavras-chave.** MLVA; peste; VNTR.

**Abstract.** A set of twenty strains of *Yersinia pestis* isolated during the investigation of an outbreak in a focus of the Araripe, municipality of Exu, state of Pernambuco, Brazil, was analyzed for six VNTR (variable number of tandem repeats) loci. The strains, conserved in the bacterioteca SRP (bacterial collection of the Reference Service in Plague), were reactivated and the identification confirmed by bacteriological bacteriophage susceptibility to anti-plague. Changes in the genome were screened for the presence or absence of virulence genes in plasmids prototypical *Y. pestis* and High-Pathogenicity Island (HPI) of yersinias by multiplex-PCR. The strains proved to be genetically related by MLVA (analysis of multiple loci of variable number of tandem repeats), which reflects the epidemiological relationship of these isolates.

**Keywords.** MLVA; plague; VNTR.

## Introdução

A *Yersinia pestis*, bactéria da família Enterobacteriaceae, foi responsável por três grandes pandemias de peste e ainda persiste em várias regiões da Ásia, da África e das Américas, com notificação de casos humanos associados à infecção de reservatórios animais em áreas rurais (Perry e Fetherston, 1997; Zietz e Dunkelberg, 2004; Drancourt, 2013).

A reemergência da peste na Índia, no Equador e na Argélia, a ocorrência de epidemias como a que ocorreu na República Democrática do Congo (RDC) e a possibilidade de uso da *Y. pestis* como arma biológica em atos terroristas renovaram o interesse sobre o estudo do bacilo e o desenvolvimento de técnicas que possibilitem determinar a origem e rastrear as cepas durante eventos inusitados (Koirala, 2006). O conhecimento das características dos isolados de cada foco permitirá detectar a introdução de

Recebido 17dez12  
Aceito 30jul2013  
Publicado 23jan14

Tabela 1. Características dos isolados de *Yersinia pestis*, segundo a data de isolamento, procedência, perfis de virulência e VNTR. P600 = 600 pb; P660 = 660 pb; P720 = 720 pb, Pb j = pulgas *Polygenis bolhsi jordani*; Xc = *Xenopsylla cheopis* B1 = *Bolomys lasiurus*, 1S = primeiro subcultivo; 2S = segundo subcultivo

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

uma nova cepa e a sua origem, se de outro foco ou por ato deliberado (Inglesby et al., 2000; Gage e Kosoy, 2005; Bertherat, 2006).

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

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

Os estudos de tipagem molecular de cepas brasileiras de *Y. pestis* por diferentes técnicas, como a *RAPD-PCR* (Leal, 1998), *PCR-ribotipagem* (Sobreira, 2002) e *RFLP IS100* (Silva, 2004), revelaram, na maioria das vezes, padrões genômicos idênticos entre elas, independentemente das fontes, procedência e ano, demonstrando um baixo poder discriminatório. Entretanto, Oliveira et al, (2012), num estudo com *MLVA* (análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem), mostrou que as cepas de *Y. pestis* apresentam polimorfismo.

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

## Métodos

### Bactérias e condições de cultivo

Foram estudadas 20 cepas de *Y. pestis* pertencentes

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

Primers	Gene	Tamanho	Localização
5'-CGC GAA TTC GAC GTA ATA TAT GAA AAA AAT CA-3'	caf1	500 pb	Plasmídeo pFra
5'-CCG CTG CAG ATT ATT GGT TAG ATA CGG-3'			
5'-AGA GCC TAC GAA CAA AAC CCA C-3'	lcrV	800 pb	Plasmídeo pYV
5'-GCA GGT GGT GGC AAA GTG AGA T-3'			
5'-AAG TTCTAT TGT GGC AAC C-3'	pla	920 pb	Plasmídeo pPst
5'-GAA GCG ATA TTG CAG ACC-3'			
5'-AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC-3'	irp2	300 pb	Cromossomo
5'-TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT-3'			

**pb = pares de base**

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

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

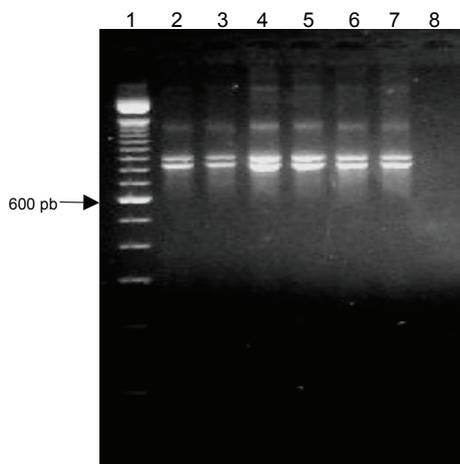


Figura 1. Análise dos produtos por ribotipagem-PCR de culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: "100 bp DNA ladder", 2: P. Exu 44 1S, 3: P. Exu 53 2S, 4: P. Exu 57 1S, 5: P. Exu 57 2S, 6: P. Exu 60 1S, 7: P. Exu 60 2S, 8: controle negativo.

### Extração do DNA genômico

Um mililitro da cultura em BHI foi centrifugado a 12.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante descartado, o sedimento suspenso em 500 µl de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado homogeneizado com 500 µl de TE, 10 µl de lisozima (10 mg/ml) e 10 µl de proteinase K (5 mg/ml). A suspensão foi incubada a 60 °C por 20 minutos seguido da adição de 100 µl de STE (SDS 2,5%; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,25 M), 15 minutos de incubação a 60 °C, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130 µl de acetato de amônio a 7,5 M, mantida no banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos. Aproximadamente 700 µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado com aproximadamente 420 µl de isopropanol a -20 °C por 24 horas seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 10 µl de água deionizada estéril e conservado a -20 °C. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-borato 0,089 M; áci-

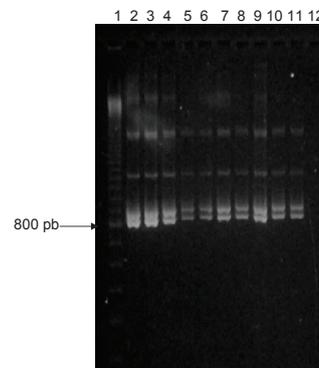


Figura 2. Comparação dos amplicons por ribotipagem-PCR, colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: "100 bp DNA ladder", 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu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

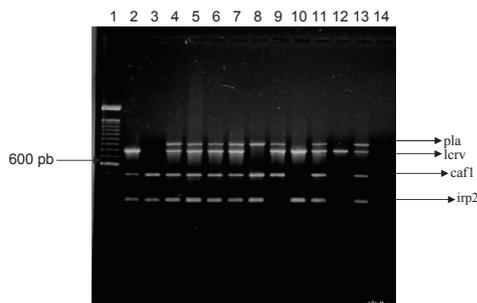


Figura 3. Produtos das ampliações, por Multiplex-PCR, dos genes de virulência *pla*, *lcrV*, *caf1*, *irp2* nas culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder, 2: P. Exu 54 2S, 3: P. Exu 74 2S, 4: P. Exu 31 2S, 5: P. Exu 51 1S, 6: P. Exu 67 2S, 7: P. Exu 59 2S, 8: P. Exu 36 2S, 9: P. Exu 53 2S,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

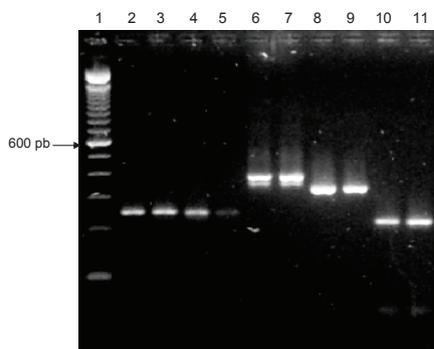


Figura 4. Amplificações, por PCR, dos VNTRs das culturas de *Y. pestis* com os primers 1AB. Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 36 2S e 3: P. Exu 42 2S; com os primers ms46, linhas 4: P. Exu 30 2S e 5: P. Exu 40 1S; com os primers M58 linhas 6: P. Exu 67 2S e 7: P. Exu 61 2S; com os primers M37,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

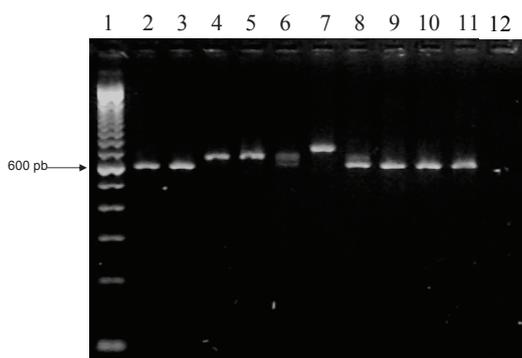


Figura 5. Amplificações, por PCR, com os primers ms06 e colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu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

do bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M), a 100 V e visualização sob luz ultravioleta (UV) após coloração em solução de brometo de etídio (15 mg/ml) (Maniats et al, 1989). A quantificação foi realizada por comparação com uma

quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *Hind* III usando o programa Kodak 1D (Image Analysis software).

### Análise da presença de marcadores de patogenicidade

A presença dos plasmídeos prototípicos (*pPst*, *pYV* e *pFra*) e da ilha alta de patogenicidade (*HPI*) da *Y. pestis* foi inferida pela técnica *Multiplex-PCR* utilizando oligonucleotídeos dirigidos a três genes de virulência (*pla*, *lcrV*, *caf1*) presentes em cada um dos plasmídeos, respectivamente e para o gene cromossômico *irp2* da *HPI*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação foram descritas em Leal e Almeida, (1999) (Tabela 2). Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em todas as reações. Os segmentos amplificados através da *multiplex-PCR* foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Borato sob voltagem de 100 V, corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador sob UV e digitalizados em câmara Kodak usando o programa Kodak 1D (Image Analysis software). Como padrão de peso molecular foi usado o marcador “100 base-pair DNA ladder” (Invitrogen, Brasil).

### PCR-ribotipagem

O DNA extraído de cinco culturas que apresentaram colônias com morfologia diversas, pequenas (lisas) e grandes (rugosas) (P. Exu 47 2S, P. Exu 54 2S, P. Exu 59 2S, P. Exu 60 2S e P. Exu 74 2S), o DNA dos isolados que apresentaram dois subcultivos (P. Exu 57 1S e 2S, P. Exu 60 1S e 2S), os isolados do conjunto de pulgas (P. Exu 44 1S) e do seu roedor hospedeiro (P. Exu 53 2S) foram submetidos à reação de *PCR-ribotipagem* para confirmar a identidade genética da espécie. Foi usado a amplificação por *PCR* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores planejados por Kostman et al. (1992) dirigidos às sequências conservadas dos genes 16S-23S do *rDNA*. As reações foram realizadas como descrito por Pereira et al. (2002). Um controle negativo, sem DNA, foi incluído. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e analisados nas mesmas condições citadas para a reação de *Multiplex-PCR*.

### Amplificação por PCR dos locos VNTRs

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

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

As reações foram realizadas em termociclador Bio-

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

Primers	VNTR / nº de bases do repeat	Fonte
5'-GGTTAGGTAGGGTGTGAAG-3' 5'-AAAGAGGCTAAGTGGCAA-3'	1 AB / 4	Adair et al. 2000
5'-CAGGTTTTACGTTATTTCTGAAGG-3' 5'-CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA-3'	ms46 / 7	Le Flèche et al. 2001
5'-AATTTTGCTCCCCAAATAGCAT-3' 5'-TTTTCCCATTAGCGAAATAAGTA-3'	ms06 / 60	Le Flèche et al. 2001
5'-GAATCGCGGGTTGACGCTGTTGAGC-3' 5'-GCTGAACAGCCCCATAAACCGGAGC-3'	M34 / 9	Klevytska et al. 2001
5'-GCCACAGGAAGAGGACATTTTCAGAGAAAAC-3' 5'-GTTGCTAAAACGATACCGCTACGATCAGC-3'	M37 / 10	Klevytska et al. 2001
5'-GCGATAACCCACATTATCACATAACCAACAC-3' 5'-GCTGATGGAACCGGTATGCTGAATTTGC-3'	M58 / 17	Klevytska et al. 2001

metra. Os ciclos térmicos consistiam de 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto e 72 °C por 1 minuto terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos como adotado por Oliveira et al. (2012), nas reações com os iniciadores 1AB. Para os demais iniciadores foram utilizados os parâmetros já descritos na literatura (LeFlèche et al., 2001; Klevytska et al., 2001).

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

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

## Resultados

As 20 cepas do estoque estavam acondicionadas em dois subcultivos que levou a tentativa de recuperação de 40 culturas (duas culturas por cepa) correspondendo a subcultivos subsequentes realizados em diversos anos (Tabela 1). Em cinco culturas em placas de BAB foram observados dois tipos de colônias morfologicamente diferentes (colônias grandes e colônias pequenas). Foi obtido crescimento em 22 culturas sendo seis do primeiro subcultivo e 16 do segundo. Todas as colônias de *Y. pestis* foram lisadas pelo bacteriófago antipestoso confirmando assim a pureza das amostras.

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

Dez culturas (cinco do primeiro subcultivo e cinco

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

Dos seis VNTR analisados cinco se revelaram monomórficos gerando amplicons de aproximadamente 250 pb (1AB, ms46), 380 pb (M58), 350 pb (M37) e 230 pb (M34) (Figura 4). Apenas o VNTR ms06 se revelou polimórfico gerando três alelos de 600, 660 e 720 pares de base (pb) (Figura 5). O tamanho da repetição do VNTR ms06 (60 pb) é a base da diversidade dos amplicons. O alelo de 600 pb foi observado em cinco culturas do primeiro subcultivo e em 12 do segundo; o de 660 pb em uma cultura do primeiro subcultivo e duas do segundo e o alelo de 720 pb em duas culturas do segundo subcultivo. As culturas pareadas das duas cepas P. Exu 57 1S e 2S e P. Exu 60 1S e 2S revelaram os mesmos perfis de VNTR (600 pb).

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

Os dois tipos de colônias morfologicamente diferentes (colônias grandes e colônias pequenas) revelaram os três alelos. Em três cepas (P. Exu 47 2S, P. Exu 60 2S, P. Exu 74 2S), colônias pequenas e grandes, foi observado o

mesmo perfil P 600. A P. Exu 54 2S, colônias pequenas e grandes apresentaram o alelo de 660 pares de base. O alelo de 720 pb foi encontrado na cepa P. Exu 60 2S colônia grande enquanto a colônia pequena desta cepa apresentou um alelo atípico com duas bandas de 600 e 660 pb, que também foi observado no subcultivo da P. Exu 59 2S colônia pequena (Figura 5).

## Discussão

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

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

No nosso estudo por *MLVA*, os repiques sucessivos das culturas P. Exu 57 1S (primeiro subcultivo), P. Exu 57 2S (segundo subcultivo), P. Exu 60 1S (primeiro subcultivo) e P. Exu 60 2S (segundo subcultivo) não acarretaram perda ou ganho de repetições, uma vez que apresentaram o mesmo número de unidades, diferentemente do relatado por Leal (1999) e Leal et al. (2000), no entanto Oliveira et al, (2012) não detectou alteração nos *VNTR* em culturas parentais e subculturas derivadas por cultivos sucessivos de várias regiões do nordeste brasileiro, (Leal-Balbino et al., 2001) observaram estabilidade *in vitro* em uma cepa submetida a sucessivos repiques.

Um fato interessante observado no decorrer da pesquisa foi que colônias fenotipicamente diferentes (colônias pequenas e grandes) de uma mesma cultura (P. Exu 59 e P. Exu 60) apresentaram alelos diferentes para o mesmo marcador *VNTR*. Nestas cepas, diferentemente das colônias grandes, cujo *VNTR* é monomórfico, as pequenas apresentam dois alelos. Esse achado sugere uma população mista em um mesmo cultivo, o que justificaria os dois alelos. Essa situação é característica de *VNTR* presentes em microssatélites e não em minissatélites (Le Flèche et al., 2001), como é o caso do loco ms06.

Uma possível contaminação da cultura foi descartada pela ribotipagem-*PCR* e também pelo teste com o bacteriófago antipestoso dessas culturas. Uma cepa isolada de um conjunto de pulgas (P. Exu 44 1S) e outra isolada de seu roedor hospedeiro (P. Exu 53 2S) surpreendentemente

apresentaram alelos diferentes para o mesmo marcador (ms06) com variação de uma repetição. Dessa maneira, o polimorfismo nesse *VNTR* (ms06), isoladamente não é ideal para identificar este grupo de cepas e assim o seu valor para estudos epidemiológicos é limitado, visto que os outros analisados *VNTR* não apresentaram polimorfismos.

Os resultados obtidos justificam conceder prioridade e investir maciçamente no estudo do maior número possível de *VNTR*, o que possibilitará a constituição de um banco de padrões característicos das cepas brasileiras de *Y. pestis*, permitindo a comparação da taxa de variação desses locos com a de possíveis clones não relacionados, bem como o rastreamento de novas cepas introduzidas natural ou deliberadamente no foco.

Neste trabalho, as cepas de *Y. pestis* obtidas durante a investigação de uma epizootia de curta duração apresentaram uma estreita relação genética revelada por cinco marcadores monomórficos e pelo polimorfismo em apenas um marcador *VNTR* (ms06). Essa conclusão baseia-se no modelo proposto por Girard et al, (2004) para determinação dos ciclos de transmissão de *Y. pestis* por meio da taxa de mutação para marcadores *VNTR* e respalda-se nos resultados obtidos por Oliveira et al, (2012), que trabalhou com cepas de diversas procedências (focos), fontes e anos de isolamento em que três de seis *VNTR* eram polimórficos.

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

## Conclusões

As cepas de *Y. pestis* obtidas durante a investigação de uma epizootia de curta duração apresentaram uma estreita relação genética revelada por cinco marcadores monomórficos e pelo polimorfismo em apenas um marcador (ms06), caracterizando assim o *MLVA* como uma ferramenta adequada para estudos da diversidade genética.

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

## Referências

- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P. 2000. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1516-1519.
- Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR. 1985. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 207-218.
- Aragão AI, Seoane ACM, Leal TCA, Leal NC. 2002. Vigilância da peste no Estado do Ceará: 1991-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 143-148.
- Baltazard M. 1968. Viagem de estudo ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisas sobre a peste. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35:143-148.

- Bertherat E. 2006. Abstract Interregional Plague Meeting, Antananarivo, Madagascar.
- Drancourt M. 2013. 72 – Plague. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition) 584-590.
- FUNASA. 2002. Peste, in: Guia de Vigilância Epidemiológica 5: 641-652.
- Gage KL, Kosoy M.Y. 2005. Natural history of plague: from more than a century of research. Annual Review of Entomology 50:505-528.
- Girard JM, Wagner DW, Vogler AJ, Keys C, Allender CJ, Drickamer LC. 2004. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 8408-8413.
- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Karimi Y. 1978. Diagnostic rapid de l'infection pesteuse au laboratoire. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales 71:45-48.
- Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham LP, Wong J, Keim P. 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. Journal of Clinical Microbiology 39: 3179-3185.
- Koerner JF, Layton M, Mcdade J, Osterholm MT, O'toole T, Parker G, Perl TM, Russel PK, Schoch-Spana M, Tonat K. 2000. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense 283: 2281-2290.
- Koirala J. 2006. Plague: Disease, Management, and Recognition of Act of Terrorism. Infectious Disease Clinics of North America 20:273-287.
- Kostmam Y, Edlind TD, Lipuma JJ, Stull TL. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction rubotyping. Journal of Clinical Microbiology. 30:2082-2087.
- Leal NC. 1998. Potencial do uso de PCR e hibridização com sondas moleculares no estudo da *Yersinia pestis*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 102pp.
- Leal NC, Almeida AMP. 1999. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 41:339-342.
- Leal NC, Almeida AMP, Leal TCA, Sobreira M. 2000. Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. Brazilian Journal of Microbiology 31: 20-24.
- Leal-Balbino TC. 2001. Análise dos plasmídeos e do loco *pgm* em diferentes cepas de *Yersinia pestis* Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100pp.
- LeFlèche P, Hauck Y, Onteniente I, Prieur A, Denoëud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G. 2001. A tandem repeats database of bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiology 1:2.
- Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC, Gage KL. 2005. Identifying sources of human exposure to plague. Journal of Clinical Microbiology 43: 650-656.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Oliveira MBM, Barros MPS, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, Balbino VQ, Leal NC, Almeida AMP, Leal-Balbino T.C. 2012. Genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. Genetics and Molecular Research 11: 3414-3424.
- Perry RD, Fetherston JD. 1997. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. Clinical Microbiology Reviews 10: 35-66.
- Pereira MSV; Leal NC; Leal, TCA; et al. 2002. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Letters in Applied Microbiology 34:1-5.
- Pourcel C, Andre-Mazeaud E, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. Microbiology 4: 22.
- Silva ACM. 2004. Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* dos focos do estado do Ceará, Brasil, por RFLP-IS100. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 61pp.
- Sobreira M. 2002. Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100 pp.
- Zietz BP e Dunkelberg H. 2004. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 207:168-178.