

Revista da

# Biologia

Volume 11(2)

Janeiro 2014

[ib.usp.br/revista](http://ib.usp.br/revista)

Malacofauna fóssil  
Genética de bactérias



## Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios e revisões) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

**ISSN1984-5154**

**[www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista)**

## Contato

[revistadabiologia@gmail.com](mailto:revistadabiologia@gmail.com)

### Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321  
Cidade Universitária, São Paulo  
São Paulo, SP Brasil  
CEP 05508-090

## Volume 11(2)

Publicado em janeiro de 2014

## Expediente

### Editor Executivo

Carlos Rocha

### Coordenadores

Agustín Camacho

Daniela Soltys

Pedro Ribeiro

Rodrigo Pavão

### Editores científicos

Fabrizio Beggiato Baccaro

Carlos Ribeiro Vilela

Sônia Godoy Bueno Carvalho Lopes

### Consultores científicos

Marcelo Veronesi Fukuda

Jorge Alves Audino

Carolini Kaid Dávila

Nancy de Castro Stoppe

Fernanda Cardoso de Freitas

Pedro Aurélio Costa Lima Pequeno

### Editores gráficos

Juliana Roscito

Leonardo M. Borges



# Volume 11(2)

## Índice

- A malacofauna fóssil da Bacia de Itaboraí, Rio de Janeiro: histórico dos estudos e perspectivas para o futuro** 1  
The fossil mollusks of Itaboraí Basin, Rio de Janeiro: historical review and future prospects  
*Rodrigo Brincalepe Salvador e Luiz Ricardo Lopes de Simone*
- Relação genética entre as cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no foco da chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil, por MLVA** 7  
Relationship analysis of *Yersinia pestis* strains isolated during the epidemic focus of Araripe, Pernambuco, Brazil, by MLVA  
*Morse Edson Pessoa Junior, Gerlane Tavares de Souza, Silvana Santos, Tereza Cristina Leal Balbino, Nilma Cintra Leal, Maria Betânia Melo de Oliveira & Alzira Maria Paiva de Almeida*

# A malacofauna fóssil da Bacia de Itaboraí, Rio de Janeiro: histórico dos estudos e perspectivas para o futuro

The fossil mollusks of Itaboraí Basin, Rio de Janeiro: historical review and future prospects

Rodrigo Brincalepe Salvador<sup>1,2\*</sup> e Luiz Ricardo Lopes de Simone<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart; Stuttgart, Alemanha

<sup>2</sup>Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen; Tübingen, Alemanha

<sup>3</sup>Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; São Paulo, SP, Brasil

Contato do autor: salvador.rodrigo.b@gmail.com

**Resumo.** Os calcários da Bacia de Itaboraí (Paleoceno Médio) guardam um registro fóssil riquíssimo, composto principalmente por mamíferos e gastrópodes pulmonados, mas também contando com aves, répteis, anfíbios e vegetais. Esses fósseis começaram a ser estudados na década de 1930, com o início da exploração do calcário para a produção de cimento, e muitos mais foram descobertos durante as décadas seguintes, até a bacia ser abandonada com o final das atividades da pedreira nos anos 80. Só recentemente o estudo desses fósseis foi retomado. Apesar da extensa pesquisa, o conhecimento sobre a fauna fóssil de Itaboraí permanece incompleto, não indo muito além das descrições originais das espécies.

**Palavras-chave.** *Gastropoda; Mollusca; Paleoceno Médio; Pulmonata; Terciário.*

**Abstract.** The limestones of Itaboraí Basin (Middle Paleocene) harbors a rich fossil record, mainly of mammals and pulmonate gastropods, but also containing birds, reptiles, amphibians and plants. The studies started in the 1930's, with the beginning of limestone extraction for cement production. Many new fossils were discovered in the next decades until the end of the quarry's activity in the 1980's, when the basin was abandoned. Only recently the studies have started again. Despite the extensive research, the knowledge of Itaboraí's fossil fauna still remains largely incomplete, not venturing much beyond the species' original description.

**Keywords.** *Gastropoda; Middle Paleocene; Mollusca; Pulmonata; Tertiary.*

A Bacia de São José de Itaboraí, ou simplesmente Bacia de Itaboraí, localiza-se no estado do Rio de Janeiro (Fig. 1). É uma das menores bacias do Brasil, mas, apesar do tamanho, apresenta um rico registro fóssil do Paleoceno (início do período Terciário). Sua riqueza fossilífera, entretanto, ficou em segundo plano em relação a outro tipo de riqueza: após a descoberta de rochas calcárias de bom grau de pureza, a bacia começou a ser explorada pela Companhia Nacional de Cimento Portland Mauá. Durante as escavações, muitos fósseis foram encontrados (notavelmente, os primeiros foram os moluscos) e estudados principalmente pelos pesquisadores de duas instituições do Rio de Janeiro: o Museu Nacional e a Divisão de Geologia e Mineralogia do DNPM (Departamento Nacional de Produção Mineral). A exploração do calcário para a produção de cimento durou cerca de 50 anos (1933 a 1984) e cada vez que um novo fóssil era encontrado na bacia, menos rochas restavam para novas descobertas (Rodrigues Francisco e Cunha, 1978; Bergqvist *et al.*, 2008).

Com o término das escavações, interrompeu-se a drenagem da água que se acumulava no fundo da bacia e, desse modo, um lago se formou na depressão, sendo utilizado atualmente para o abastecimento de água do município (Bergqvist *et al.*, 2008). Como resultado, hoje os afloramentos fossilíferos são poucos e de difícil acesso. Ainda assim, a Bacia de Itaboraí é um sítio paleontológico muito importante e, portanto, em 1995 foi criado o Parque Paleontológico de São José de Itaboraí com o intuito de preservá-lo (Bergqvist *et al.*, 2008).

## Os fósseis de Itaboraí

Os fósseis mais estudados da Bacia de Itaboraí são sem dúvida os mamíferos, com cerca de 40 espécies conhecidas, dentre as quais os marsupiais são os mais diversos, com presença marcante também de ungulados (Bergqvist *et al.*, 2006). Além dos mamíferos, a bacia contém

Recebido 17dez12

Aceito 30jul2013

Publicado 23jan14

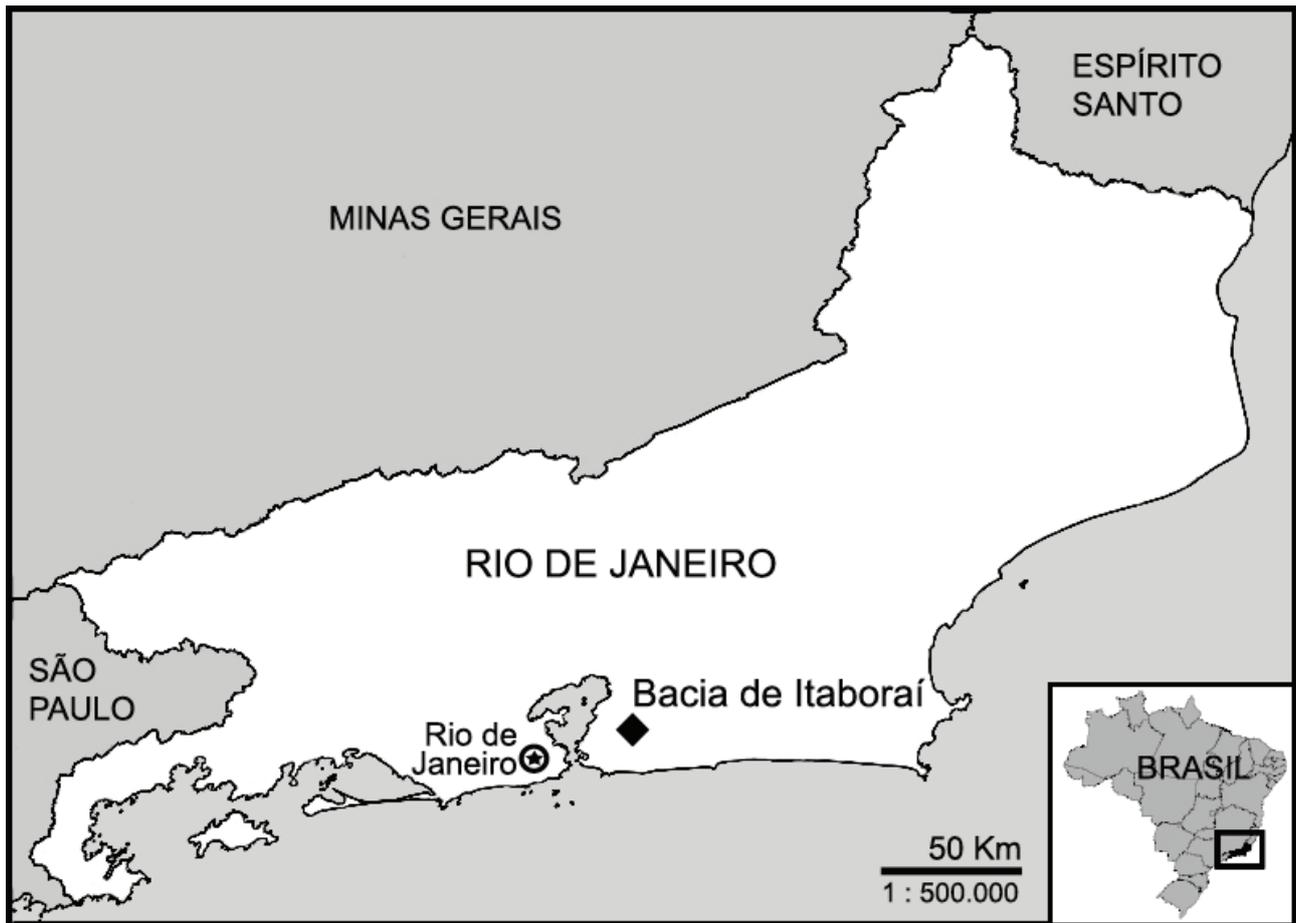


Figura 1. Localização da Bacia de Itaboraí. Adaptado de <http://commons.wikimedia.org>.

moluscos, répteis, anfíbios, aves e plantas (Bergqvist *et al.*, 2006).

A malacofauna fóssil de Itaboraí, isto é, a sua fauna de moluscos, é muito diversa, sendo inteiramente composta por pulmonados. A Ordem Pulmonata é um grupo de gastrópodes terrestres e de água doce, cuja principal característica, como o próprio nome já diz, é a presença de um “pulmão”. Estima-se que existam cerca de 35.000 espécies de pulmonados, atuais e fósseis, distribuídas pelo mundo inteiro com exceção da Antártica e representando, portanto, a mais bem sucedida “invasão” do ambiente terrestre pelos moluscos (Solem, 1984; Pearce e Örstan, 2006).

No Brasil, há aproximadamente 700 espécies atuais conhecidas de pulmonados, mas estima-se que exista pelo menos três vezes esse número (Simone, 2006). O registro fóssil mundial de Pulmonata é rico, mas no Brasil ele infelizmente não é muito expressivo: até o momento, há cerca de 30 espécies conhecidas (Simone e Mezzalira, 1994), sendo que cerca de 20 espécies são de Itaboraí; daí a importância dessa fauna.

### Histórico dos estudos

Os fósseis da Bacia de Itaboraí são de extrema importância no cenário da Paleontologia brasileira e mundial, devido à sua riqueza e diversidade e especialmente à sua idade paleocênica, sendo um registro “logo após” o

evento de extinção do final do Cretáceo. Entretanto, apesar de sua importância, a paleofauna de Itaboraí é em grande parte desconhecida fora do Brasil, principalmente porque a maioria dos trabalhos foi publicada em português e em periódicos nacionais de circulação muito restrita, cenário esse que só mais recentemente começou a mudar. Assim, aqui foi resumido o conhecimento sobre a malacofauna da bacia, apresentado como um histórico dos estudos seguido por algumas perspectivas para o futuro.

#### 1928 – 1946: os primeiros estudos

Após a descoberta da Bacia de Itaboraí, logo no início das escavações, alguns fósseis de gastrópodes foram encontrados e três pequenas coleções foram criadas (Rodrigues Francisco e Cunha, 1978). A primeira coleção se extraviou nas dependências do Serviço Geológico e Mineralógico, Rio de Janeiro. A segunda foi enviada à paleontóloga Carlota J. Maury (do *American Museum of Natural History*, Nova York, EUA), mas o material precário, composto somente por moldes internos incompletos, permitiu apenas um breve relato em um artigo lidando com fósseis do Brasil em geral (Maury, 1929). A terceira coleção, feita por Alberto R. Lamego, continha espécimes melhores (inclusive uma mandíbula crocodiliana) e também foi enviada a Maury. Com esses novos fósseis (Fig. 2), foi possível descrever quatro espécies novas de pulmonados: *Brasileneia arethusae*, *Bulimulus fazendicus*, *Itaborahia lamegoi*

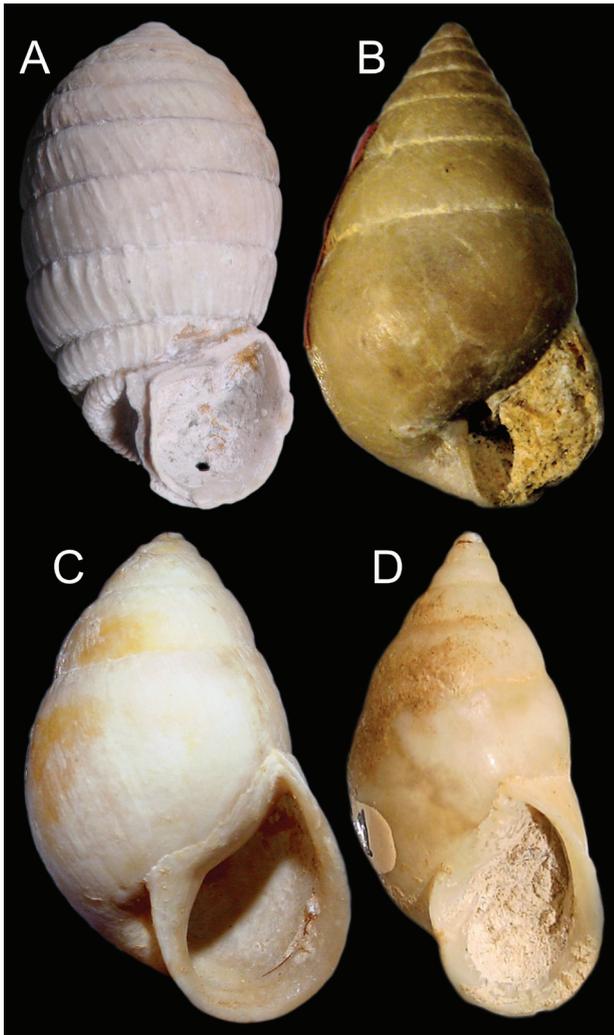


Figura 2. As primeiras espécies encontradas em Itaboraí. A. *Brasilennea arethusae* (altura da concha: 21 mm). B. *Bulimulus fazendicus* (16,5 mm). C. *Eoborus sanctijosephi* (44,5 mm). D. *Itaborahia lamegoi* (30 mm).

e *Strophocheilus sanctijosephi*, sendo os dois novos gêneros, *Brasilennea* e *Itaborahia*, endêmicos da bacia (Maury, 1935). Provavelmente por ser o único trabalho escrito em inglês, essas quatro espécies foram praticamente as únicas de Itaboraí que ficaram conhecidas por paleontólogos do restante do mundo.

A seguir, Oliveira (1936) publicou uma nota corrigindo no trabalho de Maury (1935) dados referentes aos coletores e fornecendo a localização de espécimes adicionais em coleções de instituições cariocas não mencionados por Maury. Logo depois, veio o primeiro trabalho lidando com a geologia da bacia (Leinz, 1938), com uma descrição das sequências de rochas que permanece basicamente válida até hoje, recebendo apenas refinamentos posteriores. Uma década depois, Mezzalira (1946) descreveu um novo gastrópode, *Australorbis itaboraiensis*, uma espécie de água doce, enquanto todas as demais eram terrestres. Entretanto, esse gênero foi posteriormente sinonimizado com *Biomphalaria* (International Commission on Zoological Nomenclature, 1965) e a espécie passou então a se chamar *Biomphalaria itaboraiensis*.

#### 1946 – 1952: os mamíferos e a idade dos calcários

Somente muito tempo após a descoberta dos moluscos, os primeiros mamíferos e restos vegetais foram encontrados em Itaboraí (Price e Paula Couto, 1946a, 1946b; Simpson, 1947; Magalhães, 1948). Transcorrido mais alguns anos, a descoberta de mais mamíferos permitiram a datação dos calcários da bacia. A idade que autores anteriores sugeriam para a bacia era muito variável, indo desde o Cretáceo Superior até o Plioceno, dependendo do enfoque dado por cada um (para uma lista completa, ver Bergqvist *et al.*, 2006). Enfim, Paula Couto (1952) correlacionou a fauna de mamíferos de Itaboraí com a do Grupo Rio Chico da Argentina, estabelecendo a idade Paleocênica. Essa idade está hoje bem estabelecida: Bergqvist *et al.* (2006) propõem uma idade entre 59 e 57 Ma (milhões de anos) para essas rochas, chamando esse intervalo de tempo informalmente de “Paleoceno Médio”.

#### 1953 – 1990: os microgastrópodes e outras descobertas

A próxima espécie de Pulmonata descoberta foi *Clausilia magalhaesi*, um registro interessante da família Clausiliidae (Trindade, 1953). Trindade (1956) descreveu *Brasilennea arethusae* var. *minor*, uma variedade pequena da espécie, que posteriormente Brito (1967) elevou à categoria de espécie, resultando no binômio *Brasilennea minor*. Além disso, Brito (1967) descreveu também duas espécies novas, *Carinifex fluminensis* e *Bulimulus carvalhoi*, além de colocar o gênero *Itaborahia* em sinonímia com *Bulimulus*. Klappenbach e Olazarri (1970) descreveram o novo gênero fóssil *Eoborus* para alocar os Strophocheilidae fósseis do Brasil, Uruguai e Argentina; assim, a espécie *Strophocheilus sanctijosephi* de Itaboraí passou a ser *Eoborus sanctijosephi*.

A partir da década de 1970, o processo de tamisação (isto é, a separação de objetos diminutos através de uma peneira) passou a ser utilizado nas coletas, resultando na descoberta de microgastrópodes. Ferreira e Coelho (1971) descreveram novas espécies dessa fauna diminuta (*Carychium sommeri* e *Vertigo mezzalirai*), assim como outras novas espécies maiores: *Brachypodella britoi*, *Bulimulus trindadeae* e *Strobilopsis mauryae*. A seguir, Palma e Brito (1974) descreveram as novas espécies *Bulimulus ferreirai* e *Bulimulus sommeri*, além de transferirem *Carinifex fluminensis* para o gênero *Vorticifex*. Finalmente, Ferreira e Coelho (1989) descreveram a nova espécie *Austrodiscus lopesi*. Além dos moluscos, diversos outros fósseis eram descobertos conforme a extração de calcário prosseguia, dentre eles anfíbios (Estes, 1972), palinórfos (Curvello, 1981; Lima e Cunha, 1986), aves (Alvarenga, 1983) e serpentes (Albino, 1990). Em 1984, a extração do calcário cessa e a bacia é abandonada (Bergqvist *et al.*, 2008).

#### 1999: atualização da geologia da bacia

Após quase uma década sem novidades, surge uma excelente atualização do perfil geológico da bacia (Medeiros e Bergqvist, 1999). Essas autoras definiram três sequências estratigráficas na bacia, correspondentes às sequências indicadas por Leinz (1938). Para o presente trabalho,

interessam apenas as duas sequências paleocênicas, denominadas S1 e S2. A sequência S1 é a inferior, ou seja, a mais antiga, e é composta por rochas carbonáticas de origem química (relacionadas à atividade hidrotermal da bacia) e terrígena (resultado de fluxos gravitacionais que traziam sedimentos para dentro da bacia). Os calcários cinzentos desta sequência contêm todas as espécies de pulmonados conhecidas na bacia, assim como alguns restos de plantas, mamíferos e répteis. Após a deposição de S1, formaram-se fissuras nessa camada por dissolução da rocha. Sedimentos terrígenos foram transportados para dentro da bacia por fluxos gravitacionais e preencheram essas fissuras. Tais sedimentos deram origem à sequência S2, de idade mais jovem, onde se encontra a grande maioria dos fósseis da bacia, notavelmente os diversos mamíferos. Algumas espécies de pulmonados aparentemente também eram encontradas em S2, mas tais fósseis provavelmente pertenciam a S1 e foram secundariamente incluídos em S2 (Ferreira e Coelho, 1971; Rodrigues Francisco e Cunha, 1978; Bergqvist *et al.*, 2006; Salvador e Simone, 2013).

#### 2003 – presente: retomada dos estudos

Ribeiro (2003) apresentou mudanças na classificação de algumas espécies de pulmonados, mas sem indicar a razão para tal; ela revalidou o gênero *Itaborahia*, transferindo para ele as espécies *Bulimulus lamegoi*, *B. carvalhoi*, *B. trindadeae* e *B. coelhoi*, além de estabelecer a sinonímia entre *Bulimulus fazendicus* e *B. ferreirai*. Entretanto, como esse trabalho é um resumo de congresso, seus atos nomenclaturais não têm validade oficial de acordo com o ICZN, o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (International Commission on Zoological Nomenclature, 1999). A seguir, é publicado o livro de Bergqvist *et al.* (2006), um relato bastante completo dos estudos sobre Itaboraí. Interessantemente, esses autores aceitaram as mudanças na nomenclatura dos moluscos propostas por Ribeiro (2003), tornando-as válidas segundo o ICZN.

Após esse trabalho, as pesquisas foram sendo retomadas. Inicialmente, isso se deu de forma mais tímida, como o relato sobre icnofósseis de Souto (2007) e a brevíssima revisão bibliográfica sobre a malacofauna de Rodrigues e Fonseca (2007), que inclusive rejeitou as mudanças nomenclaturais feitas por Ribeiro (2003). Entretanto, mais recentemente estudos sobre Itaboraí começaram a reaparecer em congressos, em dissertações de pós-graduação, e em artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, lidando tanto com os moluscos (Salvador, 2011; Salvador e Simone, 2011a, 2011b; Salvador *et al.*, 2011; Salvador e Simone, 2012, 2013) quanto com os mamíferos (Bergqvist e Tinoco, 2011; Castro *et al.*, 2011; Aquino, 2012) e palinórfos (Abranches *et al.*, 2011). Isso não só indica que as pesquisas sobre Itaboraí estão retornando, mas também que estão começando a explorar novos caminhos. Até então, os trabalhos sobre a bacia haviam lidado somente com as descrições das espécies e a geologia, com pouquíssimos comentários sobre seu paleoambiente. Já com os trabalhos recentes, além da taxonomia, tópicos como paleoecologia, paleobiogeografia e paleoambiente, começaram a ser abordados mais diretamente.

Esses últimos trabalhos obviamente trouxeram novidades para a malacofauna de Itaboraí. Salvador *et al.* (2011) revisaram o gênero *Brasilennea* e sua alocação anterior na família Streptaxidae, julgando que esses fósseis pertencem na verdade à família Cerionidae. Essa mudança é de grande significado biogeográfico, uma vez que é um registro muito distante da distribuição atual da família (Ilhas do Caribe), e paleoecológico, uma vez que os streptaxídeos são tipicamente carnívoros enquanto os cerionídeos são herbívoros. Já Salvador e Simone (2012) descreveram duas espécies novas, *Brasilennea guttula* e *Eoborus rotundus*, encontradas na coleção do Museu de Ciências da Terra, no Rio de Janeiro, além de relatarem um novo registro da espécie *Plagiodontes aff. dentatus* para a bacia, conhecida desde o Mioceno até o Recente, na Argentina e Uruguai. Além disso, esse trabalho ressalta o importante papel das coleções de museus não só na manutenção do conhecimento passado, mas também como fonte de novas descobertas.

Finalmente, o trabalho de Salvador e Simone (2013) revisou toda a fauna de moluscos da bacia, trazendo diversas mudanças (Tabela 1): o gênero *Itaborahia* foi revalidado, contando apenas com sua espécie-tipo, *I. lamegoi*; *Bulimulus sommeri* foi considerada sinônimo de *I. lamegoi*; *Strobilops mauryae* foi considerada sinônimo de *Brasilennea arethusae*; *Vorticifex fluminensis* foi considerada sinônimo de *Eoborus sanctijosephi*; *Clausilia magalhaesi* foi transferida para o gênero *Temesa*; *Vertigo mezzalirai* foi

Tabela 1. Classificação atual das espécies de pulmonados fósseis da Bacia de Itaboraí, de acordo com Salvador e Simone (2013).

FERUSSACIIDAE
<i>Cecilioides sommeri</i> (Ferreira & Coelho, 1971)
GASTROCOPTIDAE
<i>Gastrocopta itaboraiensis</i> Salvador & Simone, 2013
<i>Gastrocopta mezzalirai</i> (Ferreira & Coelho, 1971)
ORTHALICIDAE
<i>Bulimulus fazendicus</i> Maury, 1935
<i>Bulimulus trindadeae</i> Ferreira & Coelho, 1971
<i>Cortana carvalhoi</i> (Brito, 1967)
<i>Cyclodontina coelhoi</i> (Palma & Brito, 1974)
<i>Leiostracus ferreirai</i> (Palma & Brito, 1974)
<i>Itaborahia lamegoi</i> Maury, 1935
<i>Plagiodontes aff. dentatus</i> (Wood, 1828)
PLANORBIDAE
<i>Biomphalaria itaboraiensis</i> (Mezzalira, 1946)
STROPHOCHEILIDAE
<i>Eoborus fusiforme</i> Salvador & Simone, 2013
<i>Eoborus rotundus</i> Salvador & Simone, 2012
<i>Eoborus sanctijosephi</i> (Maury, 1935)
UROCOPTIDAE
<i>“Brachypodella” britoi</i> Ferreira & Coelho, 1971

transferida para *Gastrocopta*; *Bulimulus coelhoi* foi transferida para *Cyclodontina*; *Bulimulus ferreirai* foi transferida para *Leiostracus*; *Carychium sommeri* (família Ellobiidae) foi transferida para *Ceciloides* (família Ferussaciidae); e, finalmente, a classificação da espécie *Brachypodella britoi* nesse gênero é posta em dúvida. Além disso, foram descritos um novo gênero, *Cortana*, para alocar a espécie previamente classificada como *Bulimulus carvalhoi*, e duas novas espécies *Eoborus fusiforme* e *Gastrocopta itaboraiensis*, encontradas nas coleções dos museus cariocas. Finalmente, o estudo também apontou que a Bacia de Itaboraí possui os registros fósseis mais antigos das famílias Ferussaciidae, Gastrocoptidae, Orthalicidae e Strophocheilidae.

### Perspectivas para estudos futuros

A maioria dos fósseis de Itaboraí conta apenas com sua descrição original. O primeiro passo é sem dúvida revisar essa fauna (e flora), algo que acaba de ser feito no caso dos moluscos (Salvador e Simone, 2013), mas que ainda é necessário para o restante. Além disso, os fósseis da bacia têm grande potencial para estudos paleobiogeográficos, algo até agora abordado apenas de maneira muito breve e superficial (Simpson, 1971; Salvador e Simone, 2013). Finalmente, a exuberante fauna da bacia incita em especial trabalhos sobre seu paleoambiente e paleoecologia, uma área na qual os mamíferos certamente teriam grande destaque, como mostra Aquino (2012). Enfim, muito ainda pode ser feito com os importantes fósseis de Itaboraí e, portanto, espera-se que essa nova leva de trabalhos sejam apenas os primeiros de muitos.

### Agradecimentos

A Marcelo V. Fukuda (IB-USP) e um revisor anônimo, pelos comentários e sugestões. A CAPES, pela concessão da bolsa (CAPES PROAP-2010; Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Departamento de Zoologia, IB-USP) a R.B.S.

### Referências

- Abranches CTS, Garcia MJ, Bergqvist LP, Aquino B. 2011. Novos achados palinológicos na Bacia de Itaboraí e sua contribuição para o entendimento da dieta de alguns mamíferos paleocênicos. XXII Congresso Brasileiro de Paleontologia: 330-332.
- Albino AM. 1990. Las serpientes de São José de Itaboraí (Edad Itaboraiense, Paleoceno Medio), Brasil. *Ameghiniana* 27(3-4): 337-342.
- Alvarenga HMF. 1983. Uma ave Ratitae do Paleoceno brasileiro: Bacia calcária de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Série Geologia* 41: 1-11.
- Aquino B. 2012. Estudo do desgaste dentário de notoungulados (Mammalia) da Bacia de São José de Itaboraí, Rio de Janeiro (Itaboraiense). Dissertação de mestrado (inédita). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Bergqvist LP, Tinoco P. 2011. Didelphimorphia da Bacia de S. J. de Itaboraí, Rio de Janeiro (Paleoceno): dos dentes ao corpo. XXII Congresso Brasileiro de Paleontologia: 643-646.
- Bergqvist LP, Mansur K, Rodrigues MA, Rodrigues Francisco BH, Perez RAR, Beltrão MCMC. 2008. Bacia São José de Itaboraí, RJ: berço dos mamíferos no Brasil. In: Winge M, Schobbenhaus C, Souza CRG, Fernandes ACS, Berbert-Born M, Queiroz ET, editores. *Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil*. Publicado na Internet: [www.unb.br/ig/sigep/sitio123/sitio123.pdf](http://www.unb.br/ig/sigep/sitio123/sitio123.pdf).
- Bergqvist LP, Moreira AL, Pinto DR. 2006. Bacia de São José de Itaboraí: 75 Anos de História e Ciência. Rio de Janeiro: Serviço Geológico do Brasil, CPRM.
- Brito IM. 1967. Gastrópodos continentais do Paleoceno do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim de Geologia do Instituto de Geociências da UFRJ* 1: 7-28.
- Castro LOR, Aquino B, Bergqvist LP. 2011. Análise da dentição molar de *Colbertia magellanica* (Mammalia, Notoungulata), Bacia de Itaboraí, Rio de Janeiro (Itaboraiense) sob o enfoque do macrodesgaste dentário e das variabilidades morfológica e biométrica. XXII Congresso Brasileiro de Paleontologia: 797-799.
- Curvello WS. 1981. Esporos de fungos na bacia calcária de S. José de Itaboraí, RJ. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 53(1): 210.
- Estes R. 1972. The first fossil record of caecilian amphibians. *Nature* 239: 228-231.
- Ferreira CS, Coelho ACS. 1971. Novos gastrópodes pulmonados da Bacia calcária de São José de Itaboraí, RJ, Brasil. *Geocronologia. Anais da Academia Brasileira de Ciências* 43(supl.): 463-472.
- Ferreira CS, Coelho ACS. 1989. Novo gastrópode fóssil da Bacia de São José de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Endodontidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(supl. IV): 193-195.
- International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). 1965. Opinion 735. *Biomphalaria* Preston 1910 (Gastropoda): grant under the plenary powers of precedence over *Planorbina* Haldeman, 1842, *Taphius* H. & A. Adams, 1855, and *Armigerus* Clessin, 1884. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 22(pt. 2): 94-99.
- International Commission on Zoological Nomenclature. 1999. *International Code of Zoological Nomenclature, Fourth Edition*. Londres: The International Trust for Zoological Nomenclature.
- Klappenbach MA, Olazarri J. 1970. Notas sobre Strophocheilidae (Moll. Gastr.), III. *Eoborus*, nuevo género para especies fósiles de esta familia sudamericana. *Archiv für Molluskenkunde* 100(3/4): 179-182.
- Lima MR, Cunha FLS. 1986. Análise palinológica de um nível linhítico da Bacia de São José de Itaboraí, Terciário do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 58(4): 580-588.
- Leinz V. 1938. Os calcareos de São José, Niteroi, Estado do Rio. *Mineração e Metalurgia* 3(15): 153-155.
- Magalhães J. 1948. Sobre a ocorrência de vegetal fóssil na Fazenda São José, Mun. De Guaxindiba, R.J. *Mineração e Metalurgia* 13(75): 194.
- Maury CJ. 1929. Novas coleções paleontológicas do Serviço Geológico do Brasil. *Boletim do Serviço Geológico e Mineralógico do Brasil* 33: 1-23.
- Maury CJ. 1935. New genera and new species of fossil terrestrial Mollusca from Brazil. *American Museum Novitates* 764: 1-15.
- Medeiros RA, Bergqvist LP. 1999. Paleocene of the São José de Itaboraí Basin, Rio de Janeiro, Brazil: lithostratigraphy and biostratigraphy. *Acta Geologica Leopoldensia* 22(48):

- 3-22.
- Mezzalira S. 1946. *Australorbis itaboraiensis* n. sp. Revista do Instituto Geológico e Geográfico 4(2): 158-160.
- Oliveira E. 1936. Molluscos fósseis de Iporanga e Itaborahy. Notas Preliminares e Estudos do DNPM 15: 4-6.
- Palma JMC, Brito IM. 1974. Paleontologia e estratigrafia da Bacia de São José de Itaboraí, Rio de Janeiro. Anais da Academia Brasileira de Ciências 46(3/4): 383-406.
- Paula Couto C. 1952. Fossil mammals from the beginning of the Cenozoic in Brazil - Marsupialia: Polydolopidae and Borhyaenidae. American Museum Novitates 1559: 1-27.
- Pearce TA, Örstan A. 2006. Terrestrial Gastropoda. In: Sturm, CF, Pearce TA, Valdés A, editores. The mollusks: a guide to their study, collection, and preservation. Pittsburgh: American Malacological Society 261-285.
- Price LI, Paula Couto C. 1946a. Vertebrados fósseis do Eoceno Inferior de Itaboraí. Notas Preliminares e Estudos do DNPM 31: 1-3.
- Price LI, Paula Couto C. 1946b. Vertebrados terrestres do Eoceno na bacia calcária de Itaboraí. Mineração e Metalurgia 11(64): 212-213.
- Ribeiro AMC. 2003. A família Bulimulidae (Gastropoda-Pulmonata) na Bacia de São José de Itaboraí, Paleoceno do Estado do Rio de Janeiro. XVIII Congresso Brasileiro de Paleontologia: 232.
- Rodrigues VMC, Fonseca VMM. 2007. O estado da arte de taxonomia dos gastrópodes (Pulmonata) do Paleoceno da Bacia de São José de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro. Anuário do Instituto de Geociências 30: 253.
- Rodrigues Francisco BH, Cunha FLS. 1978. Geologia e estratigrafia da Bacia de São José, Município de Itaboraí, RJ. Anais da Academia Brasileira de Ciências 50(3): 381-416.
- Salvador RB. 2011. Revisão taxonômica da malacofauna fóssil da Bacia de Itaboraí (Paleoceno), Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado (inédita). São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Salvador RB e Simone LRL. 2011a. Distribuição geográfica das famílias Cerionidae e Urocoptidae (Gastropoda, Pulmonata) com vistas ao seu registro fóssil. XXII Encontro Brasileiro de Malacologia: 249.
- Salvador RB, Simone LRL. 2011b. The importance of Itaboraí Basin (paleocene) as the home to early records of many pulmonate snail families. XXII Congresso Brasileiro de Paleontologia: 521-524.
- Salvador RB, Simone LRL. 2012. New fossil pulmonate snails from Itaboraí Basin, Paleocene, Brazil. Archiv für Molluskenkunde 141(1): 43-50.
- Salvador RB, Simone LRL. 2013. Taxonomic revision of the fossil pulmonate mollusks of Itaboraí Basin (Paleocene), Brazil. Papéis Avulsos de Zoologia 53(2): 5-46.
- Salvador RB, Rowson B, Simone LRL. 2011. Rewriting the fossil history of Cerionidae (Gastropoda, Pulmonata): new family assignment of the Brazilian Paleocene genus *Brasilennea* Maury, 1935. Journal of Molluscan Studies 77(4): 445-447
- Simone LRL. 2006. Land and Freshwater Mollusca of Brazil. São Paulo: EGB, Fapesp.
- Simone LRL, Mezzalira S. 1994. Fossil Molluscs of Brazil. Boletim do Instituto Geológico 11: 1-202.
- Simpson GG. 1947. A new Eocene marsupial from Brazil. American Museum Novitates 1357: 1-7.
- Simpson GG. 1971. The evolution of marsupials in South America. Anais da Academia Brasileira de Ciências 43(supl.): 103-118.
- Solem A. 1984. A world model of land snail diversity and abundance. In: Solem A, van Bruggen, AC, editors. World-wide snails: biogeographical studies on non-marine Mollusca. Leiden: E.J. Brill 6-22.
- Souto, PRF. 2007. Os coprólitos da Bacia de São José de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: Carvalho, IS. Paleontologia: Cenários da Vida, Vol. 1. Rio de Janeiro: Interciência p811-818.
- Trindade NM. 1953. Contribuição à paleontologia de São José de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro. Revista Científica 4(3/4): 37-46.
- Trindade NM. 1956. Contribuição ao estudo da malacofauna da São José de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro. Notas Preliminares e Estudos do DNPM 96: 1-22.

# 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).

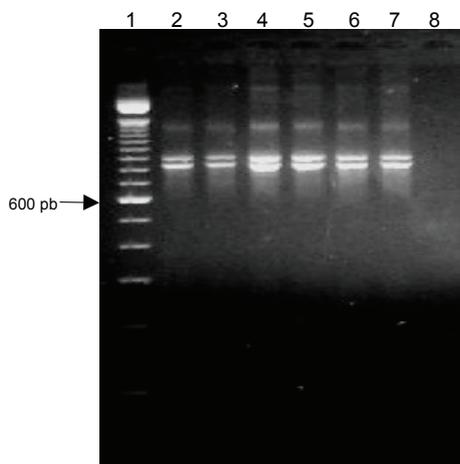


Figura 1. Análise dos produtos por ribotipagem-PCR de culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: "100 bp DNA ladder", 2: P. Exu 44 1S, 3: P. Exu 47 2S, 4: P. Exu 53 2S, 5: P. Exu 57 1S, 6: P. Exu 57 2S, 7: P. Exu 60 1S, 8: controle negativo.

### 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-

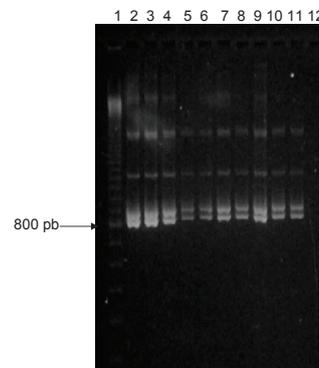


Figura 2. Comparação dos amplicons por ribotipagem-PCR, colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: "100 bp DNA ladder", 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu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

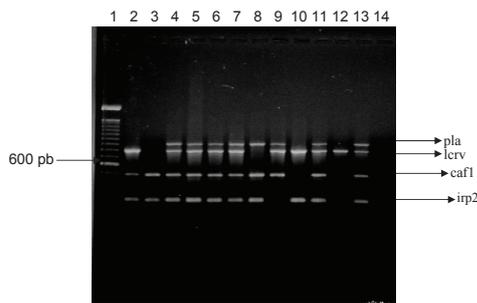


Figura 3. Produtos das ampliações, por Multiplex-PCR, dos genes de virulência *pla*, *lcrV*, *caf1*, *irp2* nas culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder, 2: P. Exu 54 2S, 3: P. Exu 74 2S, 4: P. Exu 31 2S, 5: P. Exu 51 1S, 6: P. Exu 67 2S, 7: P. Exu 59 2S, 8: P. Exu 36 2S, 9: P. Exu 53 2S,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

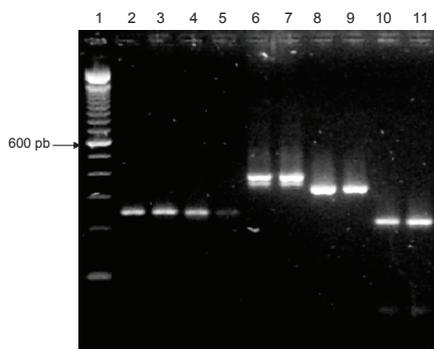


Figura 4. Amplificações, por PCR, dos VNTRs das culturas de *Y. pestis* com os primers 1AB. Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 36 2S e 3: P. Exu 42 2S; com os primers ms46, linhas 4: P. Exu 30 2S e 5: P. Exu 40 1S; com os primers M58 linhas 6: P. Exu 67 2S e 7: P. Exu 61 2S; com os primers M37,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

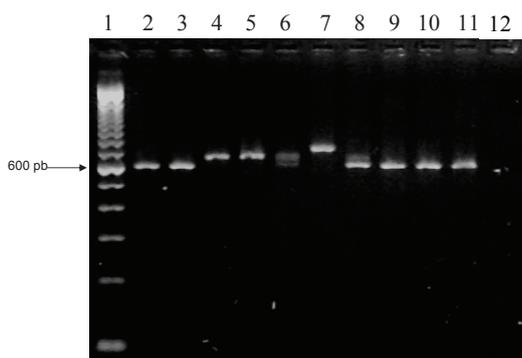


Figura 5. Amplificações, por PCR, com os primers ms06 e colônias grandes (cg) e pequenas (cp) das culturas de *Y. pestis*. Linhas 1: “100 bp DNA ladder”, 2: P. Exu 47 2S cp, 3: P. Exu 47 2S cg, 4: P. Exu 54 2S cp, 5: P. Exu 54 2S cg, 6: P. Exu 59 2S cp, 7: P. Exu 59 2S cg, 8: P. Exu 60 2S cp, 9: P. Exu 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'-AAAGAGGCTAAGTGCAA-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'-GCTGAACAGCCCCATAAAACCGGAGC-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 morfológicamente 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 morfológicamente diferentes (colônias grandes e colônias pequenas) revelaram os três alelos. Em três cepas (P. Exu 47 2S, P. Exu 60 2S, P. Exu 74 2S), colônias pequenas e grandes, foi observado o

mesmo perfil P 600. A P. Exu 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 F, 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.