



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

ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS
DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS
BACTERIANOS

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

RECIFE / PE – BRASIL
2002

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

**ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS
DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nilma Cintra Leal

**RECIFE / PE – BRASIL
2002**

Trabalho desenvolvido no Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/MS) com o suporte financeiro do PAPES II-FIOCRUZ (Ref. 25250384), do CNPq (Proc. 141362/98-7) e da FACEPE.

Ao meu Pai,

*Não a memória, mas à história da pessoa
mais humana que conheci, que ao viver se
fez exemplo.*

*Por trilhar os caminhos por você ensinados
cheguei até aqui.*

À minha Mãe,

O meu porto seguro.

Dedico esta conquista.

ANÁLISE DAS REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS DO rRNA 16S-23S EM DIFERENTES GÊNEROS BACTERIANOS

MARISE SOBREIRA BEZERRA DA SILVA

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
CPqAM/FIOCRUZ – PE (Orientadora)

Profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki
UNICAP- PE

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal
CPqAM/FIOCRUZ – PE

Profa. Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
CPqAM/FIOCRUZ – PE

Prof. Dr. Marcelo Magalhães
LIKA – UFPE

Profa. Dra. Elza Luna
UFPE

Profa. Dra. Célia Maria B. Castro
LIKA – UFPE

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e de forma especial:

- À Dra. Alzira Almeida por sua orientação, confiança, amizade, incentivo, compreensão e apoio recebido durante todas as etapas deste trabalho, e sobretudo exemplo de competência e profissionalismo, minha grande admiração.
- À Dra Nilma Leal, minha co-orientadora, que me iniciou no “mundo” científico, obrigada pela parceria, amizade, competência e ensinamentos recebidos ao longo de todos esses anos.
- Ao Dr. Marcelo Magalhães pelo fornecimento de parte das culturas utilizadas neste estudo, pela amizade e apoio constante.
- Ao Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, ex-diretor, e ao Dr. José Luiz de Lima Filho, atual diretor, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) pela concessão do afastamento das minhas atividades na Instituição, desta forma contribuindo para o melhor desempenho deste trabalho.
- Ao Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, diretor no período da execução do trabalho e ao Dr. Rômulo Maciel Filho, atual diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), por facultar o uso das instalações dessa Instituição.
- À Coordenação do Doutorado em Ciências Biológicas (UFPE), Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. de Coelho pelo empenho na condução do curso, e às secretárias Adenilda Eugênia, Jacilene Duarte e Liane Salomé pela disponibilidade e apoio.
- Ao corpo docente do Doutorado em Ciências Biológicas (UFPE), pelos ensinamentos e contribuição na minha formação profissional.

- À Profa. Dra. Laíse de Holanda, revisora deste trabalho, e aos examinadores pela disponibilidade com que aceitaram analisar este trabalho.
- Ao Dr. Osvaldo Pompílio, Pesquisador do Departamento de Microbiologia do CPqAM, pelas sugestões e contribuições.
- À Dra. Tereza Cristina, grande amiga e parceira, presente em todos os meus momentos, pelas contribuições e prazer da convivência.
- À Profa Dra Maria do Socorro Vieira pela amizade e oportunidade de colaboração científica.
- À Silvana Santos, Yara Nakasawa, pela grande amizade, dedicação e efficientíssimo apoio técnico.
- À Isaac, Rita, Edson e Nelson pelo grande suporte técnico.
- A mais nova geração de pesquisadores: Francisco Cariri, grande colaborador na formatação e apresentação deste trabalho, Jemima, Soraya, Raquel, Cláudia, Gerlane, Fabiana e Liciania, com vocês aprendemos mais.
- À Luciana, Virgínia e Lindinalva, bibliotecária e auxiliares do CPqAM, pela eficiente colaboração na aquisição das bibliografias.
- A George, Ulisses, Gisele e toda a equipe do Núcleo de Informática do CPqAM pelo importante apoio e colaboração.
- À Conceição e Joselma pela realização dos trabalhos xerográficos.
- Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE), pelo estímulo e compreensão.
- A todos os colegas do departamento de Microbiologia do CPqAM em especial a amiga Mirna, pela valiosa colaboração.

- À Ilma, Conceição, Maria Helena, Vera Lúcia, Moisés, Paulina, Carmelita, Kilma, Rafael, Celestina, Eliane, Felipe e demais colegas funcionários do LIKA, pela amizade e constante apoio.
 - Às amigas Dra. Célia Castro e Graça Antas do Setor de Microbiologia Clínica do LIKA, pelo constante apoio e grande amizade.
 - Aos amigos Mineo, Edneide, Kirte, Luis, Fábio, Valéria e demais amigos do CPqAM pela amizade e estímulo.
 - A todos os colegas de turma do Curso de Doutorado, em especial “Às meninas”: Marília, Neide, Raquel e Rita pelos bons momentos, convívio, amizade e solidariedade ao longo do curso. E a inesquecível “turma do Mestrado”, Constância e Neide.
 - Aos meus amigos pessoais, em especial Silvana, Luciana, Albênia, Fátima, Vilma e Lucineide, pela amizade, solidariedade e compreensão das ausências.
 - Ao brilho das crianças: Deborah, Maria Emília, Bione Neto, João Victor e Larissa, meus sobrinhos, fonte de toda a esperança.
 - À minha Mãe, aos meus irmãos e a minha família, minha maior torcida, pela paciência, compreensão, carinho e constante estímulo.
 - Em especial ao meu companheiro Alex Bernardo, pela solidariedade, compreensão da minha ausência, carinho, amor e estímulo constantes.
 - Ao CNPq, PAPES 2-FIOCRUZ e FACEPE, pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1. Distribuição das variedades geográficas (biovar) de <i>Yersinia pestis</i>	26
--	----

ARTIGO I

Tabela 1. Distribution of the <i>Staphylococcus aureus</i> strains according to the RAPD-PCR patterns obtained with the three primers.....	32
Tabela 2. Distribution of the <i>Staphylococcus aureus</i> strains according to the ribotyping-PCR amplification patterns.....	33

ARTIGO II

Tabela 1. Distribuição das amostras de <i>Providencia alcalifaciens</i> nos diferentes ribotipos.....	47
---	----

ARTIGO III

Tabela 1. Origem e características das cepas de <i>Yersinia pestis</i> estudadas.....	69
Tabela 2. Características das cepas de <i>Yersinia enterocolitica</i> analisadas.....	71
Tabela 3. Informações sobre o sequenciamento das ISR-1 e ISR-2 das diferentes cepas de <i>Yersinia pestis</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

FIGURA 1. Organização e processamento do operon do rRNA..... 27

ARTIGO I

FIGURA 1. RAPD-PCR profiles of amplification from *Staphylococcus aureus* strains..... 31

FIGURA 2. Ribotype patterns of the 11 *Staphylococcus aureus* strains obtained by ribotyping-PCR..... 32

ARTIGO II

FIGURA 1. Gel de agarose 1,5% das amplificados geradas por Ribotipagem-PCR a partir do DNA extraído..... 48

FIGURA 2. Gel de agarose 1,5% das amplificados geradas por Ribotipagem-PCR a partir do lisado de colônias..... 49

FIGURA 3. Géis de agarose 1,5% representativo das ampliações geradas por Ribotipagem-PCR de cepas de *Providencia alcalifaciens*..... 50

ARTIGO III

FIGURA 1. Géis de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S 73

FIGURA 2. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA de cepas de *Yersinia enterocolitica*..... 74

FIGURA 3. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o primer descrito por Chun et al. (1999)..... 75

FIGURA 4. Géis de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas clivados com as enzimas..... 76

FIGURA 5. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas clivados com a enzima *Alu I*..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS

BAB	-Blood Agar Base
BHI	-Brain Heart Infusion
LB	-Luria Bertani
dNTP	-desoxirribonucleotídeo trifosfato
TE	-Tris-HCl 1mM; EDTA 10mM
TBE	-Tris-botrato, ácido bórico, EDTA
pb	-pares de base
PCR	-Polymerase Chain Reaction
RAPD	-Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	-Restriction Fragment Length Polymorphisms
rRNA	-RNA ribossomal
tRNA	-RNA transportador
tRNA ^{Ala}	-RNA transportador de Alanina
tRNA ^{Ile}	-RNA transportador de Isoleucina
tRNA ^{Glu}	-RNA transportador de Glutamina
UFC	-Unidade Formadora de Colônia
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
mM	-Milimolar
ml	-Mililitro
μM	-Micromolar

RESUMO

Os ribossomos bacterianos possuem três tipos de rRNA: 23S, 16S e 5S; codificados por genes organizados em operons separados por regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), que contém um ou mais genes de tRNA. A informação genética derivada do operon do rRNA fornece uma informação taxonômica valiosa, visto que as ISRs, especialmente as que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem menor pressão evolucionária, e assim apresentam maior variação genética que as regiões que codificam os rRNAs. A ribotipagem vem sendo aplicada com sucesso para detectar polimorfismos genéticos entre bactérias. Neste trabalho, analisamos o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR de amostras de *Staphylococcus aureus*, *Providencia alcalifaciens* e das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*, utilizando “primers” desenhados com base em sequências complementares das regiões conservadas 16S e 23S dos genes de rRNA de várias espécies bacterianas. Os padrões de amplificação das ISRs mostraram-se característicos para cada gênero e espécie. Sete perfis de ribotipagem foram observados nas cepas de *S. aureus* e trinta e quatro perfis foram mostrados em *P. alcalifaciens*, evidenciando polimorfismo genético nestas espécies. As cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* analisadas exibiram o mesmo padrão de amplificação, enquanto que as amostras de *Y. enterocolitica* mostraram quatro padrões distintos. Os perfis obtidos foram analisados através das técnicas de sequenciamento e perfil de restrição. Os resultados confirmam a alta homologia entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* que é atribuída a evolução de *Y. pestis*, que se supõe um clone derivado de *Y. pseudotuberculosis*.

Palavras chave: Ribotipagem; *Staphylococcus aureus*; *Providencia alcalifaciens*; *Yersinia*.

ABSTRACT

Bacterial ribosomes carry three types of rRNA: 23S, 16S and 5S encoded in genes organized in operons separated by intergenic spacer regions (ISRs) containing one or more tRNA genes. The genetic information derived from the rRNA operon provides a valuable taxonomic information, since the ISRs, especially those located between the 16S and 23S regions of the rDNAs, suffer lesser evolutionary pressure, then they present greater genetic variation than the regions encoding for the rRNAs. Ribotyping has been applied successfully to detect genetic polymorphism among bacteria. In this work, we analyzed the amplification profile of the ISRs obtained by PCR using primers drawn to complementary sequences of the conserved regions 16S-23S of the rRNA genes from several bacteria species in samples of *Staphylococcus aureus*, *Providencia alcalifaciens* and the three pathogenic species of *Yersinia*. The amplification patterns of the ISRs obtained revealed to be characteristic for each genus and species. Seven ribotyping profiles had been observed among the *S. aureus* strains studied and thirty four profiles in *P. alcalifaciens* evidencing great genetic polymorphism in these species. The strains of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* analyzed displayed the same amplification profile which was different from the *Y. enterocolitica* profile. Four distinct ribotyping profiles were observed in the *Y. enterocolitica* strains analyzed. The profiles obtained from the three species had been analyzed by sequencing and restriction. The results confirmed the high homology between *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*, attributed to the *Y. pestis* evolution, supposed to be a clone derived from *Y. pseudotuberculosis*.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	01
Objetivo geral	02
Objetivos específicos	02
Revisão da literatura	03
Tipagem Molecular.....	03
Métodos baseados nos Ácidos Nucléicos.....	04
Perfil de restrição do DNA genômico e plasmidial.....	04
Sondas derivadas de seqüências de inserção.....	05
Análise do RFLP do DNA ribossomal.....	06
Métodos de tipagem baseados na PCR.....	07
RAPD-PCR.....	07
Ribotipagem-PCR.....	07
Aplicações dos métodos de tipagem.....	08
<i>Staphylococcus aureus</i>	08
Epidemiologia e tipagem em <i>Staphylococcus aureus</i>	08
O gênero <i>Providencia</i>	09
Epidemiologia e tipagem em <i>Providencia alcalifaciens</i>	10
O gênero <i>Yersinia</i>	13
História da peste.....	15
Epidemiologia e tipagem em <i>Yersinia pestis</i>	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ARTIGOS	28
ARTIGO I: Typing of human and bovine <i>Staphylococcus aureus</i> by RAPD-PCR and ribotyping-PCR.....	29
ARTIGOII: Ribotipagem-PCR de isolados clínicos de <i>Providencia alcalifaciens</i>	35
ARTIGO III: Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em amostras de yersínias patogênicas.....	51
CONCLUSÕES	78
PERSPECTIVAS	79
ANEXOS	80
Normas para publicação	
Journal of Medical Microbiology.....	81
Journal of Clinical Microbiology.....	84

INTRODUÇÃO

Geralmente os agentes causadores de uma infecção em um surto derivam de uma única célula, ou seja são clonais ou altamente relacionados. Os organismos de origem clonal são membros de uma mesma espécie com os mesmos fatores de virulência, e características bioquímicas e genômicas iguais, entretanto apresentam diversidade ao nível de espécie suficiente para diferenciar entre isolados de diferentes origens, diferentes períodos e diversas regiões geográficas, podendo ser subtipados.

As técnicas de tipagem são epidemiologicamente importantes para o monitoramento de surtos de infecções, transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, reconhecimento de clones virulentos, relação clonal entre amostras, e monitoramento através de programas de controle ou erradicação das doenças.

Os métodos de tipagem são subdivididos em fenotípicos, que empregam marcadores fenotípicos, e moleculares que utilizam marcadores moleculares e genéticos. Os marcadores genéticos correspondem aos ácidos nucleicos e são largamente aplicados para análises taxonômicas e epidemiológicas em bactérias. Entre os diversos métodos de tipagem molecular a partir dos ácidos nucleicos destacamos a ribotipagem que corresponde à análise dos genes do DNA ribossomal (rDNA). As bactérias possuem rRNAs 23S, 16S e 5S, os genes dos rRNAs 16S e 23S apresentam regiões muito conservadas que são adequados para análises taxonômicas, e as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), presentes entre os genes 16S-23S, apresentam seqüências variáveis que são apropriadas para avaliações epidemiológicas sendo empregados para tipagens de culturas bacterianas.

Neste trabalho, foi analisado o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR de bactérias patogênicas de interesse regional: *Staphylococcus aureus*, agente de grande importância clínica e econômica por ser causador de um amplo espectro de doenças em animais e humanos; amostras de *Providencia alcalifaciens*, agente causador de gastroenterites e amostras das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*: *Y. pestis*, agente causador da peste, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, enteropatogênicas.

Objetivo geral

Analisar o perfil de amplificação das ISRs obtidos por PCR a partir de bactérias patogênicas de interesse regional.

Objetivos específicos

- Analisar o polimorfismo genético em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem animal e humana.
- Avaliar a diversidade genética entre amostras de *Providencia alcalifaciens* isoladas de casos de gastroenterites.
- Analisar as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) das três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, para avaliação do polimorfismo genético das ISRs em cada espécie e para análise da evolução molecular **de *Y. pestis***.

Revisão da literatura

Tipagem Molecular

A revolução da biologia molecular com a elucidação da estrutura do DNA por Crick & Watson em 1953 permitiu avanços na pesquisa epidemiológica, quando esta ciência passou a incorporar aspectos celulares e moleculares, ampliando os marcadores biológicos e o desenvolvimento da epidemiologia molecular (Hust & Rao, 1993).

Os marcadores biológicos incluem marcadores: bioquímicos, moleculares, genéticos, imunológicos e fisiológicos. O recente aumento de marcadores moleculares e genéticos disponíveis tem facilitado e aumentado o estudo da epidemiologia das doenças infecciosas (Schulte, 1993; Harrison & Griffin, 1993), bem como, o conceito de relação clonal entre isolados de microrganismos de surtos de origem comum. Muitos surtos de infecções resultam da exposição a um agente etiológico de uma mesma fonte. Em geral, os microrganismos infecciosos são clonais, ou seja, eles são originários de uma única célula e são geneticamente idênticos ou apresentam uma baixa diversidade (Swaminathan & Matar, 1993).

Ao nível de espécie as bactérias apresentam uma diversidade genética suficiente para a identificação de diferentes clones ou grupos clonais, entretanto conservam uma similaridade genética elevada, entre isolados de uma mesma espécie, coletados de diferentes fontes, locais e períodos. Os isolados são examinados para várias características que permitam uma discriminação intraespecífica com o objetivo de realizar uma subtipagem (Swaminathan & Matar, 1993).

A subtipagem tem aplicação bacteriológica ampla em saúde pública. É essencial para determinar se clones previamente reconhecidos como virulentos são reconhecidos em uma amostra, para identificar a origem da infecção em um surto, e assegurar que programas de imunização levem à erradicação do patógeno alvo, em vez de atingir formas variantes não patogênicas.

Anteriormente a subtipagem era feita apenas por marcadores fenotípicos, sendo empregados um ou vários marcadores como: biotipagem, sorotipagem,

fagotipagem e bacteriocinotipagem. Estes testes são organismo-específicos e cada organismo requer o uso de reagentes e procedimentos específicos. Os padrões de resistência a antibióticos, embora baseados em traços fenotípicos, têm sido largamente utilizados para tipar muitos isolados bacterianos, particularmente de infecções hospitalares. A resistência aos antimicrobianos frequentemente é codificada por DNA plasmidial sendo freqüente a associação entre padrão de resistência e o perfil plasmidial.

Os métodos de tipagem molecular são baseados nas características físicas de moléculas como: ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos entre outras moléculas químicas, produzidas por bactérias e são universalmente aplicáveis. Esses métodos podem ser classificados em três grandes grupos com base no tipo de macromolécula: lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos, proteínas e em ácidos nucléicos.

Métodos baseados nos ácidos nucléicos

O desenvolvimento de técnicas de isolamento, separação, clivagem e sequenciamento de ácidos nucléicos desde 1975, possibilitaram a aplicação destes métodos para vários problemas epidemiológicos.

Perfil de restrição do DNA genômico e plasmidial

Perfil plasmidial

Os plasmídeos são elementos de DNA extracromossomal de replicação autônoma presentes em muitas espécies de bactérias, mas que não são essenciais ao crescimento bacteriano normal, eles podem conter genes que codificam fatores de virulência ou resistência aos antimicrobianos. O perfil plasmidial vem sendo usado como ferramenta para subtipar várias espécies de bactérias. Por outro lado, plasmídeos de tamanhos idênticos podem diferir em seqüências de nucleotídeos, nestes casos a clivagem do DNA plasmidial com

enzimas de restrição fornece um perfil plasmidial com grande poder discriminatório, sendo útil para a subtipagem de diferentes espécies bacterianas. Embora o perfil plasmidial seja aplicável em investigações epidemiológicas ele não pode ser aplicado a todas espécies bacterianas. Muitas bactérias apresentam plasmídeos instáveis ou plasmídeos com baixa heterogeneidade de seqüências de nucleotídeos não sendo úteis para subtipagens (Swaminathan & Matar, 1993).

Análise de restrição do DNA genômico

Este método envolve a comparação do número e tamanho de fragmentos produzidos por digestão do DNA genômico com enzimas de restrição. Variações observadas entre os fragmentos de restrição gerados por uma enzima específica são denominadas Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment length Polymorphism: RFLPs). RFLPs podem resultar de rearranjos, inserção, deleção ou substituição de bases do DNA nos sítios de clivagem das enzimas. A vantagem da análise de restrição do DNA genômico é que diferente do perfil plasmidial ele é universalmente aplicável. Apresenta a desvantagem de gerar numerosos fragmentos de restrição de tamanhos muito próximos impossibilitando a análise. O uso de técnicas de transferência de DNA para suportes como membranas de náilon ou nitrocelulose (Southern blotting) e hibridização com sondas marcadas simplifica a análise dos RFLPs.

As sondas usadas para subtipagem incluem: sondas baseadas em fatores de virulência; sondas derivadas de seqüências de inserção (IS); sondas derivadas de bacteriófagos de DNA; sondas de fragmentos aleatórios do DNA genômico e sondas da região 16S-23S do rRNA (Swaminathan & Matar, 1993).

Sondas derivadas de seqüências de inserção

As seqüências de inserção (IS) são elementos transponíveis de DNA repetitivo que são encontrados em organismos procariotos e eucariotos. A presença desses elementos de DNA repetitivo favorece rearranjos

cromossômicos, causando mutações que podem gerar polimorfismos interespecíficos e podem acelerar a evolução das espécies.

Análise do RFLP do DNA ribossomal (rDNA) – Ribotipagem

A ribotipagem baseia-se no padrão de restrição dos genes do rRNA, e vem sendo aplicada com sucesso para detectar polimorfismos genéticos entre as bactérias (Grimont & Grimont, 1986). Todas as células vivas contêm rRNA classificados pela constante de sedimentação (Svedberg ou S). As células procarióticas possuem rRNAs 23S, 16S e 5S que junto a proteínas constituem os ribossomos bacterianos.

Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons formados por três genes que codificam ordenadamente os rRNAs 16S, 23S e 5S separados por uma região espaçadora intergênica (entre cada gene - ISRs), que contém um ou mais genes de tRNA. Esta estrutura é similar nas diversas espécies bacterianas. Um longo precursor é formado e processado por nucleases para liberar os rRNA maduros e os tRNA (Figura 1). O número de operons rRNA nas bactérias varia de 1 a 12 por célula e muitos contêm ISRs semelhantes. O número de cópias está relacionado ao tamanho do genoma e a velocidade de crescimento das bactérias (Grimont & Grimont, 1991). Diversos estudos envolvendo a análise das ISRs são utilizados para análises filogenéticas, taxonômicas e de epidemiologia molecular em diferentes gêneros bacterianos (Kostman *et al.*, 1992; Lobato *et al.*, 1998; Chun *et al.*, 1999).

A filogenia dos seres vivos pode ser estabelecida pela comparação das seqüências de nucleotídeos de cada gene de rRNA que apresentam regiões com seqüências muito conservadas (região invariável), que corresponde às regiões de interação das proteínas ribossômicas com o rRNA, e regiões com seqüências variáveis entre as bactérias. Em especial as ISRs, que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolucionária, logo

apresentam uma maior variação genética que as regiões que codificam o rRNA, fornecendo uma informação taxonômica ainda mais valiosa.

Em razão da conservação das seqüências de nucleotídeos dos genes de rRNA ao longo da evolução, uma única sonda construída a partir do rRNA de uma única bactéria (*Escherichia coli*) pode ser usada para hibridizar com os genes correspondentes de qualquer bactéria. Os operons do rRNA podem conter seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição ou ter estas seqüências nas suas proximidades, gerando um número de fragmentos de restrição igual ou superior ao número de cópias dos operons presentes no cromossoma bacteriano (Grimont & Grimont, 1991).

Métodos de tipagem baseados na PCR

Os métodos que envolvem a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction: PCR) oferecem muitas vantagens sobre os outros métodos de tipagem baseados nos ácidos nucléicos, por serem mais rápidos e necessitarem de poucas células do microrganismo (Mullis & Faloona, 1987). Vários métodos de tipagem baseados na PCR vem sendo utilizados:

RAPD-PCR

A genotipagem pelo polimorfismo de amplificação aleatória do DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA - RAPD) não depende do conhecimento prévio da seqüência do genoma do organismo a ser amplificada, não necessitando de “primers” específicos; apenas nanogramas de DNA são necessários e este não necessita ser fortemente purificado. Envolve a utilização de um único “primer”, de uma seqüência arbitrária, e em condições de baixa estringência, são gerados vários fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos amplificados são resultantes do anelamento do “primer” com seqüências parcialmente homólogas no DNA molde (Welsh & MacClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Ribotipagem-PCR

Esta técnica utiliza-se da organização dos operons do rRNA bacterianos. A amplificação dos genes ribossomais, que codificam o rRNA 16S ou 23S é muito utilizada para identificações ao nível de espécie (Ibraim *et al.*, 1993; Trebesius *et al.*, 1998), entretanto não são úteis para subtipagens. A utilização de “primers” que amplificam a região espaçadora intergênica (ISR), em especial a que está localizada entre os genes que codificam os rRNA 16S e 23S, geram perfis de amplificação que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos (Kostmam *et al.*, 1992; Chun *et al.*, 1999). O RFLP dos produtos de amplificação da Ribotipagem por PCR permite a discriminação entre cepas.

Aplicações dos métodos moleculares de tipagem em diferentes gêneros bacterianos

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, responsável por um amplo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais (Kloos & Sheifer, 1981). É o principal patógeno nosocomial, sendo descrito como agente etiológico significativo em infecções hospitalares; a emergência de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), tem sido o maior problema clínico (Kluytmans *et al.*, 1995). É o mais frequente microrganismo associado às mastites caprina e bovina (Harvey & Gilmour, 1988; Watts, 1988). A mastite bovina causada por *S. aureus* é uma doença de grande importância econômica para a indústria leiteira, pois causa redução na qualidade e na produção do leite, aumento do uso de drogas e serviços veterinários (Raimundo *et al.*, 1999).

Epidemiologia e tipagem em *Staphylococcus aureus*

Os portadores de *S. aureus* desempenham um papel importante na epidemiologia e patogênese da infecção, eles têm sido identificados como importante fator de risco para infecções em pacientes imunocomprometidos tais como: pacientes cirúrgicos, que fazem hemodiálise ou ainda pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou AIDS. O tratamento de portadores nasais de *S. aureus*, constitui uma estratégia preventiva em pacientes de risco (Kluytmans *et al.*, 1995).

A ocorrência de portadores sadios de *S. aureus* em animais é de grande importância no campo da saúde pública e na saúde animal. No Brasil, linhagens de *S. aureus* foram isoladas de bovinos, aparentemente sadios, em fase de lactação, na pele do úbere e tetas e menos freqüentemente nas fossas nasais (Araújo *et al.*, 1986; Pereira & Siqueira Júnior, 1995).

Atualmente vários sistemas de tipagem são usados para monitorar infecções por *S. aureus*. Uma grande variedade de métodos bioquímicos e moleculares, tais como, fagotipagem, padrão de resistência aos antimicrobianos, biotipagem, perfis cromossômicos e plasmidiais de restrição, ribotipagem e análise do padrão eletroforético em campo pulsado vêm sendo usados em investigações epidemiológicas de infecções estafilocócicas humanas e bovinas (Kapur *et al.*, 1995).

Considerando a importância clínica de *S. aureus*, sob os aspectos de saúde humana e animal, sistemas de tipagem são de grande relevância epidemiológica para o reconhecimento do surgimento e origem da infecção, da transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, reconhecimento de cepas virulentas, relação clonal entre amostras, e monitoramento de programas de vacinação (Olive & Bean, 1999).

O gênero *Providencia*

O gênero *Providencia* pertence à família Enterobacteriaceae, tribo Proteeae ou grupo *Proteus-Providencia*. Este gênero sofreu várias alterações taxonômicas. As bactérias do grupo “Providence”, denominação adotada em homenagem à cidade de Providence (Rhode Island, USA), onde foram primeiramente isoladas, foram inicialmente incluídas no gênero *Proteus* por assemelharem-se a *Proteus morganii* e *Proteus rettgeri* em vários aspectos, embora diferissem fortemente de *Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis* (Rustigian & Stuart, 1945). Mais tarde, o termo “Providence” empregado para o grupo foi modificado para *Providencia* (Kauffmann & Edwards, 1952).

O grupo *Proteus-Providencia* é composto de três gêneros: *Proteus*; *Morganella* e *Providencia* (Brenner *et al.*, 1978) e com exceção de *Proteus morganii*, ocupa uma posição marginal na família Enterobacteriaceae, cujo percentual de G+C situa-se entre 50 a 58 % nos diferentes gêneros. O conteúdo de G+C em *Providencia* varia de 39 a 42% (Falkow *et al.*, 1962; Coetzee, 1972).

O gênero *Providencia* atualmente é composto de cinco espécies: *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. heimbachae*, das quais as quatro primeiras são reconhecidas como patógenos humanos (Ewing, 1986). Estas espécies são mais comumente associadas com infecções do trato urinário na comunidade sadia e em pacientes cateterizados e isoladas de fezes diarréicas. Entretanto, podem causar infecções oportunistas variadas em pacientes hospitalizados, tais como infecções em queimaduras, septicemia, infecções de lesões cutâneas ou de ferimentos cirúrgicos e tromboflebite supurativa. As espécies deste gênero podem ser distinguidas bioquimicamente pela prova da urease e pelos testes de fermentação do adonitol, inositol, trealose, arabinose e galactose, entre outros. Apresentam antígenos termoestáveis da parede celular ou somáticos (O), flagelares (H), e antígenos de envoltório ou cápsula (K) (Penner *et al.*, 1979a, 1979b; Penner, 1984).

Epidemiologia e tipagem em *Providencia alcalifaciens*

P. alcalifaciens pode ser isolada de indivíduos sadios, por meio de métodos rotineiros empregados nos exames de espécimes fecais, sendo portanto questionado se esta bactéria é de fato o agente causador das diarréias ou se é um comensal que surge durante infecções causadas por vírus ou outros agentes bacterianos (Carpenter, 1964).

O interesse clínico em *P. alcalifaciens* aumentou depois de um estudo de caso-controle realizado em dois grupos de pacientes britânicos, um com diarréia e história de viagem anterior recente a países em desenvolvimento e outro com diarréia mas sem referir viagem para esses países; foi significativa a incidência de isolamento de *P. alcalifaciens* no primeiro grupo, sendo considerada o agente causador da “Diarréia dos Viajantes Britânicos” (Haynes & Hawkey 1989). Outro estudo caso-controle realizado com crianças indica uma associação significativa de *P. alcalifaciens* com a diarréia infantil (Albert *et al.*, 1998).

Atualmente, o papel de *P. alcalifaciens* como agente causador da gastroenterite foi comprovado em virtude do seu isolamento a partir de amostras de fezes diarréicas de um grande surto de infecção alimentar ocorrido entre crianças e professores de escolas da cidade de Fukui no Japão, consistindo no primeiro relato de um surto de infecção alimentar atribuído a *P. alcalifaciens* (Murata *et al.*, 2001).

No Brasil, *P. alcalifaciens* vem sendo algumas vezes encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarréicas de pacientes na ausência de outros patógenos intestinais (Guth & Perrella, 1996; Magalhães *et al.*, 1996).

A transmissão se dá por via oral, pela ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes, e o sorogrupo mais comum é o O:3.

Os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade em *P. alcalifaciens* ainda são pouco conhecidos. Vários estudos demonstram a habilidade invasiva em células como mecanismo de virulência deste organismo (Albert *et al.*, 1992; 1995; Mathan *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 2001), entretanto esta

característica não é demonstrada por todos os isolados de origem diarréica (Guth & Perrella, 1996).

Magalhães *et al.* (1996), observaram a correlação entre a invasividade, e a presença de um plasmídeo de 45 a 50 kb. Na análise das culturas isoladas do surto de infecção alimentar no Japão também foi observada a correlação de um plasmídeo grande com o potencial invasivo das culturas, entretanto uma cultura sem o referido plasmídeo apresentou menor grau de invasividade, sendo questionada a correlação total da invasividade com a presença do plasmídeo (Murata *et al.*, 2001). Outros estudos confirmaram a habilidade invasiva, entretanto, não demonstram nenhuma correlação entre a presença do plasmídeo de 45-50 kb e a invasividade, e questionam o papel dos plasmídeos na patogenicidade de *P. alcalifaciens* (Guth & Perrella, 1996; Sobreira *et al.*, 2001). Portanto, a presença de outros mecanismos de virulência, e o papel de *P. alcalifaciens* na diarréia necessitam ser esclarecidos.

P. alcalifaciens é bacilo gram-negativo, móvel com flagelos peritríquios e apresenta 46 antígenos O (Penner, 1979a). As culturas são classificadas em dois biogrupos, tomando-se como base a produção de gás da glicose e a fermentação do adonitol e inositol: cepas do biogrupo 1 produzem gás da glicose, fermentam adonitol mas a fermentação de inositol é variável e as culturas do biogrupo 2 não produzem gás da glicose, fermentam adonitol mas não o inositol (Ewing *et al.*, 1972). Os biogrupos 1 e 2 distinguem-se em dois zimotipos, A₁ e A₂, quanto ao perfil eletroforético da β-esterase e da fosfatase ácida (Picard *et al.*, 1991). Esta subclassificação foi confirmada por hibridização DNA/DNA (Brenner *et al.*, 1978). Através de hibridização DNA/DNA, a homologia entre as bactérias do zimotipo A₁ é de 89 a 100% a 60°C, enquanto que a homologia do zimotipo A₂ é de apenas 74 a 76% confirmando a existência de dois grupos (Brenner *et al.*, 1978; Wayne *et al.*, 1987). Pelo polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) do DNA ribossomal (rDNA), também se distinguem dois ribogrupos A₁ e A₂ (Wayne *et al.*, 1987). Estes resultados põem em dúvida a existência de uma única espécie e sugerem a existência de duas espécies dentro da atual *P. alcalifaciens* (Picard *et al.*, 1991). Outros estudos de análise do perfil de restrição do rDNA em culturas de um

mesmo Biogrupo evidenciam a existência de dois ribogrupos com diferentes ribotipos dentro de um mesmo biogrupo (Guth *et al.*, 1999; Pignato *et al.*, 1999), demonstrando um polimorfismo genético na espécie.

A heterogeneidade genética de *P. alcalifaciens* é reforçada pela presença de perfis plasmidiais heterogêneos, que inclui desde cepas sem plasmídeos a cepas com cinco plasmídeos, além do polimorfismo no padrão de RAPD-PCR e uma heterogeneidade de ribotipos identificados através da análise combinada de padrões de ribotipagem obtidos com três enzimas de restrição (Guth *et al.*, 1999; Sobreira *et al.*, 2001).

Através da ribotipagem em isolados de origem diarréica da cidade de São Paulo, foram identificados dois grupos dentro de um mesmo biotipo e observado que amostras invasivas apresentam padrões de ribotipagem distintos das amostras não invasivas representando clones específicos que são distribuídos endemicamente (Guth *et al.*, 1999). A relação clonal de amostras invasivas de *P. alcalifaciens* foi também evidenciada em culturas de origem diarréica da cidade do Recife em um estudo através de RAPD-PCR. Estes resultados sugerem que amostras invasivas e não invasivas são originadas de clones distintos, existindo uma linhagem clonal responsável pelo potencial invasivo em *P. alcalifaciens* (Sobreira *et al.*, 2001).

Por outro lado, uma análise realizada em culturas isoladas de um surto de infecção alimentar no Japão, revela uma grande homogeneidade entre as culturas através de PFGE (Murata *et al.*, 2001), esta diferença deve-se ao fato de que as culturas analisadas em estudos anteriores correspondem a isolados de casos esporádicos de gastroenterite e os isolados obtidos a partir de um surto de infecção alimentar são originários de uma mesma fonte sendo portanto clonais.

O gênero *Yersinia*

O gênero *Yersinia* foi proposto por Van Loghem (1944) para separar *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* do gênero *Pasteurella* por diferirem na reação de oxidase e na composição das bases do DNA (Mollaret & Thall, 1974); pertence a família Enterobacteriaceae e atualmente é composto de onze espécies das quais três são patógenos humanos e de animais: *Y. pestis* o agente causador da peste, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que são enteropatógenos. O conteúdo de G+C varia de 46-50 mol % entre as espécies do gênero.

Resultados de hibridização de DNA-DNA (Bercovier *et al.*, 1980) mostraram que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são fortemente relacionadas por apresentarem mais de 90% de homologia, contra apenas 48% entre essas duas espécies e *Y. enterocolitica*. Em virtude destas semelhanças foi proposto que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* fossem reclassificadas em uma só espécie com duas subespécies: *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pseudotuberculosis* e *Y. pseudotuberculosis* subespécie *pestis* (Bercovier *et al.*, 1980). Entretanto, devido às diferenças quanto ao ciclo de transmissão, quadro clínico, nível de patogenicidade e de biossegurança a separação das duas espécies foi mantida. A comparação de seqüências de genes homólogos como os genes do rRNA 16S, genes reguladores e genes estruturais do lipopolissacarídeo (LPS), de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* revela uma similaridade na seqüência de nucleotídeos de 97 a 99,7% (Ibraim *et al.*, 1993, Achtman *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que *Y. pestis* é um clone de uma cepa de *Y. pseudotuberculosis*, provavelmente sorotipo O:1b, que surgiu entre 1.500 a 20.000 anos atrás, pouco antes da primeira pandemia de peste (Achtman *et al.*, 1999; Skurnik *et al.*, 2000).

A razão das diferenças na virulência dessas duas espécies vem sendo alvo de muitos estudos. A patogenicidade nestas três espécies depende em grande parte de um plasmídeo comum o pYV (~70 kb), que codifica a dependência ao cálcio para crescimento a 37°C, uma adesina (YadA), uma lipoproteína (YlpA), várias proteínas com propriedades antifagocítica (Yop), um sistema secretor das Yops (Ysc), proteínas chaperones específicas para as Yops (Syc) e um sistema

regulatório (Lcr) (Cornelis, 2000). Em *Y. pestis* o gene *yadA* encontra-se inativado por uma mutação (Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Além deste plasmídeo, as cepas típicas de *Y. pestis* abrigam mais dois plasmídeos de virulência: o pFra (100 kb), codifica uma proteína capsular imunogênica (F1) e a toxina murina, envolvida na transmissão pelas pulgas, e o pPst (9,5 kb) que codifica uma protease também envolvida na transmissão (Perry & Fetherston, 1997).

Vários genes cromossômicos presentes nas duas espécies estão ativos em *Y. pseudotuberculosis* mas, mutados em *Y. pestis*. Em *Y. pestis* o LPS apresenta-se rugoso, ou seja desprovido de antígenos O, enquanto que em *Y. pseudotuberculosis* a síntese de antígenos O caracteriza 21 diferentes sorotipos. O locus gênico que codifica a síntese dos antígenos O está presente em *Y. pestis* e apresenta 98,9% de homologia com os genes envolvidos na biossíntese dos antígenos O de cepas de *Y. pseudotuberculosis* sorotipo O:1b. Entretanto, em *Y. pestis* esses genes estão inativados por deleção ou inserção de nucleotídeos (Skurnik *et al.*, 2000). Os genes *inv* e *ail*, envolvidos na invasão em células eucarióticas, estão inativados em *Y. pestis* pela presença de seqüências de inserção (Simonet *et al.*, 1996). A *Y. pestis* não apresenta atividade ureolítica, presente em todas as outras espécies do gênero, entretanto apresenta em seu cromossoma o locus gênico da urease, que abriga os genes estruturais e regulatórios, porém esses genes apresentam mutações espécie específica (Sebbane *et al.*, 2001).

A compreensão dos fatores que diferenciaram *Y. pestis* de *Y. pseudotuberculosis* ao nível molecular e genético podem facilitar o controle da peste e fornecer informações sobre a evolução de microrganismos patogênicos.

História da peste

A peste é uma das doenças que mais causou devastação na história da humanidade; é conhecida desde a antigüidade, acreditando-se que surgiu no Planalto Central Asiático, considerado o "Berço da Peste". Na era pré-Cristã, várias pestilências foram, erroneamente classificadas como peste.

Três grandes pandemias bem caracterizadas foram registradas durante a era Cristã. A primeira pandemia, denominada "Peste de Justiniano" (542-602 d.C) teve início na África Central se estendeu para o Egito e estima-se que chegou a matar 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia ou Peste Negra, teve início na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia. A terceira pandemia ou pandemia Contemporânea, teve seu início na China estendendo-se para Hong Kong em 1894 e de lá se espalhou para os Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Madagascar, através do transporte marítimo (Perry & Fetherston, 1997). Segundo Mollaret (1989), a expansão desta pandemia terminou durante a 2ª Guerra Mundial, quando os antigos navios foram afundados e substituídos por navios modernos à prova de ratos. Contudo, a terceira pandemia deixou focos endêmicos em várias partes do mundo.

A peste chegou ao Brasil em 1899, através do porto de Santos no Estado de São Paulo, durante a última pandemia. Inicialmente infectou várias cidades litorâneas, de onde foi eliminada através de medidas sanitárias adequadas e focalizou-se entre os roedores silvestres, na área rural, principalmente na região Nordeste (WHO, 1965). Os focos atuais estão localizados em áreas rurais dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (Vieira & Coelho, 1998; Almeida *et al.*, 2001).

A peste constitui ainda um problema de saúde pública, persistindo em vários focos naturais em diferentes países da África, Ásia e Américas. Enquadra-se entre as doenças de notificação obrigatória a nível internacional e sujeita a quarentena (classe I do regulamento Sanitário Internacional), fazendo-se necessária a vigilância permanente nas áreas de foco. Atualmente a peste está

classificada pela OMS como uma doença reemergente, pelo aumento da incidência mundial de casos humanos e ocorrência de epidemias em vários países como Índia, Peru, Equador, Madagascar, Zaire e Tanzânia (PAHO/WHO, 2002; WHO, 2000).

Epidemiologia e tipagem em *Yersinia pestis*

A persistência da peste reside na sua complexa epidemiologia. É uma doença de roedores e a transmissão se dá através da picada de pulgas infectadas. O homem contamina-se acidentalmente, ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas. O controle da população animal é extremamente difícil por encontrarem-se, geralmente, em locais inacessíveis, e a completa destruição da população de roedores não garante a extinção dos focos, porque o bacilo da peste pode sobreviver por vários anos nas carcaças dos animais mortos e reinfectar novos ocupantes das tocas. Carnívoros selvagens e domésticos (raposas, cães e gatos), também estão envolvidos no ciclo epidemiológico da peste. Eles se contaminam quando são picados por pulgas infectadas ou ao devorar roedores infectados (Perry & Fetherston, 1997).

No homem a doença pode apresentar-se sob três formas clínicas principais: bubônica, pulmonar e septicêmica. A peste bubônica é a forma mais comum, e caracteriza-se pela presença de um bubão (linfadenite regional) na região próxima à picada da pulga. A peste pneumônica representa uma forma grave da doença que é geralmente fatal, nesta forma pode ocorrer a transmissão homem a homem. Na peste septicêmica, os doentes apresentam manifestações sistêmicas. As três formas da doença respondem bem a antibioticoterapia apropriada reduzindo significativamente a mortalidade. As drogas preconizadas para o tratamento são: estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfazidina (Perry & Fetherston, 1997).

As atividades de vigilância e controle de peste no Brasil, envolvem técnicas bacteriológicas e sorológicas para a pesquisa da *Y. pestis* nos roedores (hospedeiros), pulgas (vetores), e pesquisa de anticorpos em animais sentinela/indicador: roedores, carnívoros domésticos (cães e gatos) e nos

pacientes suspeitos de peste (Almeida *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1994; Vieira & Coelho, 1998).

A peste é causada por um bacilo gram-negativo, caracterizado por apresentar um baixo número de reações bioquímicas positivas e uma grande homogeneidade, com um único sorotipo, um fagotipo, e três biovar ou variedades geográficas: Antiqua, Medievalis e Orientalis. Cada variedade foi considerada remanescente da primeira, segunda e terceira pandemias, respectivamente. Esta classificação baseia-se nos resultados das reações de fermentação do glicerol e redução do nitrato a nitrito (Tabela 1). A homogeneidade observada surpreende pelo fato da *Y. pestis* adaptar-se a diferentes tipos de hospedeiros (roedores, homem), diversas espécies de pulgas, bem como diferentes regiões geográficas (Craniel & Mollaret, 1990).

A técnica de ribotipagem é uma ferramenta útil na subdivisão dos isolados de *Y. pestis*. Guiyoule *et al.* (1994) identificaram 16 ribotipos distintos em cepas de *Y. pestis* de cinco continentes, e observaram que existe uma correlação entre os biovar e os ribotipos (Tabela 1). Dentre as cepas estudadas, foram analisadas oito cepas brasileiras, isoladas durante um mesmo surto de peste (Almeida *et al.*, 1985) e observou-se que todas pertenciam ao mesmo ribotipo, o correspondente ao que se supõe ter sido responsável pela última pandemia.

Um novo ribotipo foi observado em cepas do biovar Orientalis isoladas durante o surto de 1994 na Índia (Ramalingaswami, 1995). Posteriormente, Guiyoule *et al.* (1997) detectaram o aparecimento de três novos ribotipos de *Y. pestis*, por ocasião do atual surto de peste em Madagascar, essas cepas foram isoladas em anos diferentes e exibiram perfis plasmidial e genômico específicos, sugerindo que perfis distintos do gene rDNA podem se desenvolver em um curto período de tempo (menos de um século), em uma área geográfica específica.

Com base nos perfis de ribotipagem e sua correlação com as três variedades geográficas, foi postulada a hipótese de que um clone de *Y. pestis* do ribotipo O (Biovar Antiqua) espalhou-se da Ásia Central, Planalto Centro Asiático, para a África Central e causou a Peste de Justiniano. Posteriormente, uma variante do mesmo clone, ribotipo O, que perdeu a capacidade de reduzir o nitrato

(Biovar *Medievalis*) espalhou-se da Ásia Central para a Crimeia e causou a Peste Negra. Considera-se ainda a hipótese de um clone do ribotipo B (Biovar *Orientalis*), que causou a terceira pandemia, ser derivado do primeiro clone (ribotipo O), visto que esse clone reduz o nitrato embora tenha perdido a capacidade de fermentar o glicerol. Quanto ao perfil de restrição com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV* os dois clones diferem apenas pela perda de um sítio de restrição no ribotipo B (Guiyoule *et al.*, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 96:14043-14048.
- Albert, M.J., K. Alam, M. Ansaruzzaman, M.M. Islam, A.S. Rahman, K. Haider, N.A. Bhuiyan, S. Nahar, N. Ryan, and J. Montanaro.** 1992. Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhoea. Infection and Immunity. **60**:5017-5024.
- Albert, M.J., M. Ansaruzzaman, N.A. Bhuiyan, P.K. Neogi, and A.S. Faruque,** 1995. Characteristics of invasion of HEp-2 cells by *Providencia alcalifaciens*. Journal of Medical Microbiology. **42**:186-190.
- Albert M.J., A.S. Faruque, and D. Mahalanabis.** 1998. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. Journal of Clinical Microbiology. **36**:1433-1435.
- Almeida, A.M.P., N.C. Leal, J. Dantas-Sobrinho, F.G. Carvalho, and C.R. Almeida.** 1995. Plague surveillance in Brazil:1983-1992. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **37**: 511-516.
- Almeida, A.M.P., N.C. Leal, T.C.A. Leal, and M. Sobreira.** 2001. Manual de Peste. [Online] <http://www.cpqam.fiocruz.br> (Referência – Vigilância e Controle da peste no Nordeste).
- Araujo M.L.C., I.Y. Ito, M.E.B. Santiago, M.S. Cardoso and E.C. Cunha.** 1986. *Staphylococcus aureus*: Pesquisa de portadores bovinos em lactação e antibiograma das cepas isoladas. Revista de Microbiologia. **17**:350-355.
- Bercovier, H., H.H. Mollaret, J.M. Alonso, J. Brault, G.R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and relationship to *Y. pseudotuberculosis*. Current Microbiology. **4**:225-229.
- Brenner, D.J., J.J. Farmer III, G.R. Fanning, A.G. Steigerwalt, P. Klykken, F.W. Wathen, and W.H. Ewing.** 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus*

and *Providencia* species. International Journal of Systematic Bacteriology. **28**:269-282.

Carniel, E., and H.H., Mollaret. 1990. Yersiniosis. Comp. Immunity Microbiology Infection Disease. 13: 51-58.

Carpenter, P. 1964. The Proteus-Providence group. Recent advances. Clinical Pathology. **4**:12-23.

Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwel. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Applied and Environmental Microbiology. 65:2202-2208.

Coetzee, J.N. 1972. Genetics of the *Proteus* group. Annals of Review Microbiology. **26**:23-54.

Cornelis, G.R. 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 97:8878-8783.

Ewing, W.H. 1986. The tribe *Proteeae*. In Edwards and Ewing's. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed., p.443-459. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Ewing, W.H, B.R. Davis, and J.V. Sikes. 1972. Biochemical characteristics of *Providencia*. Public Health Laboratory. **30**:25-28.

Falkow, S., I.R. Ryman, and O. Washington. 1962. Deoxyribonucleic acid base composition of *Proteus* and Providence organisms. Journal of Bacteriology. **83**:1318-1321.

Guiyoule, A., F. Grimont, I. Iteaman, P.A.D. Grimont, M. Lefèvre, and E. Carniel. 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. Journal of Clinical Microbiology. 32:634-641.

Guiyoule, A., B. Rasoamanana, C. Buchrieser, P. Michel, S. Chanteau, and E. Carniel. 1997. Recent emergence of new variant of *Yersinia pestis* in Madagascar. Journal of Clinical Microbiology. 35:2826-2833.

Grimont, F. and P.A.D. Grimont. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Annales du Institut Pasteur/Microbiologic. 137B:165-175.

Grimont, F. and P.A.D. Grimont. 1991. La Carte D'Identite moleculaire des bacteries. Bulletin de La Societe Francese Microbiologic. 6: 9-12.

Guth, B.E.C. and E. Perrella. 1996. Prevalence of invasive ability and other virulence-associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. **45**:459-462.

Guth, B.E.C., K. Irino, and L.R. Trabulsi. 1999. Clonal structure of *Providencia alcalifaciens* strains isolated from diarrhoeal stools in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. **48**:205-209.

Harrison, L.H., and D. Griffin. 1993. Infectious diseases, p301-339, *In* P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), *Molecular Epidemiology: principles and practices*. Academic Press.

Harvey, J., and A. Gilmour. 1988. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology*. **7**:79-82.

Haynes, J. and P.M. Hawkey. 1989. *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. *British Medical Journal*. **299**:94-95.

Hust, R., and J.Y. Rao. 1993. Molecular biology in epidemiology, p 45-78, *In* P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), *Molecular Epidemiology: principles and practices*. Academic Press.

Ibrahim, A., B.M. Goebel, W. Liesack, M. Griffiths, and E. Stackebrandt. 1993. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S sequences. *FEMS Microbiology Letters*. **114**:173-178.

Kapur, V., W.M. Sischo, R.S. Greer, T.S. Whittam, and J.M. Musser. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:376-380.

Kauffmann, F., and P.R. Edwards. 1952. Classification and nomenclature of *Enterobacteriaceae*. *International Bulletin of Bacteriology Nomenclature Taxonomic*. **2**:2-8.

Kloos, W.E., and K.H. Sheifer. 1981. The genus *Staphylococcus*. *In* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Ballows and H.G. Schelegel (ed), p1548-1569. *The prokaryotes*, Berlin Heidelberg Springer Verlag.

Kluytmans, J., W. Van Leeuwen, W. Goessens, R. Hollis, S. Messer, L. Herwaldt, H. Bruining, M. Heck, A. Van Belkum, and H. Verburgh. 1995. Food-initiated outbreak of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* analysed by pheno and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:1121-1128.

Kostmam, J.R., T.D. Edlind, J.J. Li Puma, and T.L. Stull. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**: 2082-2087.

Lobato, M.J., E. Landeras, M.A. González-Hevia, and M.C. Mendoza. 1998. Genetic heterogeneity of clinical strains *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:3297-3302.

Magalhães, V., Leal, N.C., Melo, V.M, Sobreira, M. and Magalhães, M. (1996). Invasion of HeLa cells by *Providencia alcalifaciens* presumably is plasmid-encoded. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91:767-768.

Mathan, M.M., Mathan, V.I. and Albert, M.J. (1993). Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Pathology*.171:67-71.

Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. ***Methods in Enzymology***. 155:335-350.

Mollaret, H.H., and E. Thal. 1974. Genus XI. *Yersinia* Van Loghem 1944 p-330-332. In R.E. Buchanan and N.E. Giggons (ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th: Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Mollaret, H.H. 1989. Le cas de la peste. *Ann. Demog. Hist.* 101-110.

Murata T, Iida T, Shiomi Y, Tagomori K, Akeda Y, Yanagihara I, Mushiake S, Ishiguro F, and Honda T. 2001. A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Infectious Diseases*.**184**:1050-1055.

Olive, D.M., and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1661-1669.

PAHO/WHO. 2002. Emerging and reemerging diseases. [Online] wysiwyg://conteudo.corpo.mainframe.1/html.glish/HCP/HCT/EER/eer. Acessado em 24 de abril de 2002.

Penner, J.L, P.C. Fleming, G.R. Whiteley, and J.N. Hennessy. 1979a. O-serotyping *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Clinical Microbiology*. **10**:761-765.

Penner, J.L., N.A. Hinton, I.B. Duncan, J.N. Hennessy, and G.R. Whiteley. 1979b. O-serotyping of *Providencia stuartii* isolates collected from twelve hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. **9**:11-14.

Penner, J.L. 1984. Genus XII. *Providencia* Ewing 1962, p.494-496. In N.R. Krieg and J.G. Holt (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

Pereira, M.S.V., and J.P. Siqueira Júnior 1995. Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle Brazil. Letters in Applied Microbiology. **27**:229-234.

Perry, R., and J.D. Fetherston. 1997. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. Clinical Microbiology Reviews. **10**:35-66.

Picard, B., N. Picard-Pasquier, R. Krishnamoorthy, and P. Goulet. 1991. Correlation between DNA polymorphism and enzyme polymorphism argues in favour of the delineation of two species within *Providencia alcalifaciens*. Research in Microbiology. **142**:965-969.

Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PAD, and Giammanco G. 1999. Molecular characterization of genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. Journal of Clinical Microbiology. **37**:2840-2847.

Raimundo, O. M. Deighton, J. Capstick and N. Gerraty. 1999. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of coagulase gene. Veterinary Microbiology. **66**:275-284.

Ramalingaswani, V. 1995. Plague in India. Nature. **1**:1237-1239.

Rosqvist, R., M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1998. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. Nature. **334**:522-524.

Rustigian, R. and C.A. Stuart.. 1945. The biochemical and serological relationships of the organisms of *Proteus*. Journal of Bacteriology. **49**:419-436.

Schulte, P. 1993. A conceptual and historical framework for molecular epidemiology, p 5-43 In P.A. Schulte and F.P. Perera (ed), Molecular Epidemiology: principles and practices. Academic Press.

Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet. 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at specific position in the *ureD* gene. Infection and Immunity. **69**:170-176.

Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau, and P. Berche. 1996. Invasion production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of a IS200-like element within the *inv* gene. Infection and Immunity. **64**:375-379.

Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervalä. 2000. Characterization of O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene clusters of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O-1b. *Molecular Microbiology*. **2**:316-330.

Skurnik, M., and H. Wolf-Watz. 1989. Analysis of *yopA* gene encoding the Yop1 virulence of *Yersinia* spp. *Journal of Bacteriology*. **3**:517-529.

Sobreira, M., N.C. Leal, M. Magalhães, B.E.C. Guth, and A.M.P. Almeida. 2001. Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Medical Microbiology*. **50**:29-34.

Swaminathan, B., and G.M Matar. **1993. Molecular typing methods. p 26-50. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White (ed), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, Washington, DC, ASN Press.**

Trebesius, K., D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, and J. Heesemann. 1998. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**:2557-2564.

Vieira, J.B., A.M.P Almeida, and C.R. Almeida. 1994. Epidemiologia e controle da peste no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*. **27**:51-58.

Vieira, J.B. and G.E. Coelho. 1998. Peste: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*. **31**:113-119.

Watts, J.L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. **16**:41-66.

Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont,, O. Kandler, M.L. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr, and H.G. Trupper. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**:463-464.

Welsh, J. and M. MacClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. **18**:7213-7218.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18**:6531-6535.

WHO PAHO. Plague in the Americas. 1965. Scientific Publication. **115**:44-68.

WHO OMS. 2000. Human plague in 1998 and 1999. *Weekly Epidemiology Record*. **75**: 338-343.

ARTIGOS

ARTIGO I

Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR

Maria do Socorro Vieira Pereira^{1,3}, Nilma Cintra Leal², Tereza Cristina Arcanjo Leal², **Marise Sobreira**², Alzira Maria Paiva de Almeida², José Pinto Siqueira-Júnior³, Galba Maria de Campos Takaki⁴

1. Universidade Federal de Pernambuco
2. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ
3. Universidade Federal da Paraíba
4. Universidade Católica de Pernambuco

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*; RAPD-PCR; Ribotyping-PCR.

Aceito para publicação no:

Letters in Applied Microbiology (2002), “in press”
(London)

ARTIGO II

Ribotipagem-PCR de isolados clínicos de *Providencia alcalifaciens*

Marise Sobreira^{1,2}, Nilma Cintra Leal¹, Cláudia Juliana T. L. Crasto¹,
Alzira Maria Paiva de Almeida¹

1. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/MS, Recife- PE Brasil
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE Brasil

Palavras chave: *Providencia alcalifaciens*; ribotipagem; PCR.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Journal of Medical Microbiology (London)

RIBOTIPAGEM-PCR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Providencia alcalifaciens*

M. Sobreira, N.C. Leal, C.J.T.L. Castro, A.M.P. Almeida.

Resumo

Providencia alcalifaciens vem sendo apontada, há vários anos, como um dos agentes causadores da diarréia desde que algumas vezes é encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarréicas de pacientes na ausência de outros patógenos intestinais, mas apenas recentemente o seu papel como agente causador de gastroenterite foi demonstrado. Esta espécie tem se mostrado muito heterogênea quanto ao perfil plasmidial, padrões de amplificação por RAPD-PCR e polimorfismo de restrição do rDNA. Para avaliar a diversidade genética de isolados de *P. alcalifaciens* da cidade do Recife, 72 amostras obtidas de casos humanos de gastroenterite foram analisadas por Ribotipagem-PCR utilizando “primers” descritos para seqüências conservadas das regiões 16S e 23S dos genes do rRNA, para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas. Os resultados demonstraram grande polimorfismo genético entre as amostras estudadas que estão distribuídas em numerosos ribotipos. Esses dados apontam a eficácia da técnica como ferramenta epidemiológica para *P. alcalifaciens*.

Introdução

Providencia alcalifaciens vem sendo considerada como um dos agentes causadores de diarreia, desde que algumas vezes é encontrada como organismo predominante ou mesmo como cultura pura em fezes diarreicas de pacientes, principalmente crianças, na ausência de outros patógenos intestinais [1 - 4]. No entanto, foi descrita como uma bactéria comensal do trato gastrointestinal que exarceba durante infecções causadas por vírus ou outros agentes bacterianos, sendo por muito tempo questionado o seu papel na doença diarreica [5].

Sua importância clínica aumentou após ter sido apontada como agente da “diarreia dos viajantes britânicos” [6]. Recentemente, por ocasião de um grande surto de infecção alimentar ocorrido entre crianças e professores de escolas da cidade de Fukui-Japão por *P. alcalifaciens*, seu papel como agente causador da gastroenterite foi novamente evidenciado [7].

A transmissão se dá por via oral, pela ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes. Os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade em *P. alcalifaciens* ainda são pouco conhecidos, supõe-se que a habilidade invasiva em células evidenciada *in vivo* e *in vitro* esteja envolvida no mecanismo de virulência dessa bactéria [8 -10, 4, 7]. Entretanto esta característica não é exibida por todos os isolados de origem diarreica [11], sendo demonstrada também por isolados de origem não diarreica [3].

P. alcalifaciens é uma espécie fenotipicamente muito heterogênea apresentando dois biogrupos, dois zimotipos, vários sorogrupos e diversos bacteriocinotipos [5, 12, 13]. Esta heterogeneidade é reforçada pela ocorrência de perfis plasmidiais variados, além do polimorfismo no padrão de RAPD-PCR e polimorfismo de restrição do rDNA [12, 14, 15].

Diante da considerável heterogeneidade descrita em *P. alcalifaciens*, sistemas de tipagem são necessários para a determinação da estrutura genética e

monitoramento epidemiológico deste agente. A grande variabilidade de padrões de restrição do rDNA demonstrada nas espécies do grupo *Proteus-Providencia* e em particular em *P. alcalifaciens* sugere a ribotipagem como um método muito sensível para investigações epidemiológicas aplicadas ao estudo de infecções causadas por esse agente [15].

A ribotipagem tem sido proposta como uma ferramenta importante para análises taxonômicas e epidemiológicas em bactérias [16]. Esta técnica tem sua aplicação limitada por ser trabalhosa envolvendo clivagem do DNA, “Southern blotting” e hibridização com sonda. Uma outra técnica que envolve a PCR baseia-se na amplificação dos genes ribossomais, que codificam o rRNA 16S ou 23S e é muito utilizada para identificações ao nível de espécie [17, 18] mas, não se presta para subtipagens. A utilização de “primers” que amplificam a região espaçadora intergênica (ISR), em especial a que está localizada entre os genes que codificam os rRNA 16S e 23S, gera perfis de amplificação que são utilizados para identificação de eubactérias e para subtipagem de muitos gêneros bacterianos [19, 20].

O objetivo deste trabalho foi analisar isolados de *P. alcalifaciens* obtidos na cidade do Recife, através da técnica de Ribotipagem-PCR para avaliar a diversidade genética entre as amostras.

Materiais e métodos

Bactérias e condições de cultivo

Um total de 72 amostras de *P. alcalifaciens* isoladas de fezes diarréicas de casos humanos de gastroenterite foram analisadas. As culturas foram obtidas de um laboratório privado da cidade do Recife, Brasil durante o período de 1994 a 1997, e conservadas na Bacterioteca do CPqAM. Para este trabalho foram renovadas por repique em caldo infuso de cérebro e coração (Brain Heart Infusion broth, Difco: BHI) por 18 horas, incubadas a 37°C e plaqueadas em gelose peptonada (Blood Agar Base, Difco: BAB).

Extração do DNA genômico

O DNA genômico das culturas foi extraído segundo protocolo baseado em Maniatis *et al.* [21] e quantificado após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando para comparação uma quantidade conhecida do DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III.

Amplificação das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S-23S

Foi utilizado um par de “primers” desenhado por Chun *et al.* [20] para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S e 23S: 5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3' e 5'-ACGAATTCTGACTGCCMRGGCATCA-3'.

As reações foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA genômico, 40 pmol de cada “primer”, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,16mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-Pharmacia), 1,5mM de MgCl₂, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Biometra) programado para uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 30 ciclos

correspondendo cada ciclo a uma etapa de desnaturação do DNA por 1 minuto a 94°C, seguida do anelamento de 1 minuto a 50°C e alongamento de 1,5 minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato e voltagem constante de 100V, corados com brometo de etídio (15mg/ml) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado o “100 base-pair DNA ladder” (Amersham Pharmacia Biotec).

Ribotipagem diretamente das culturas em caldo

Neste ensaio uma alíquota de 200µl de cada cultura em caldo foi centrifugada e o sedimento ressuspensado em 20µl de água deionizada estéril, fervido em banho-maria por 10 minutos, para lisar as células e expor o material genético, e utilizados 10µl dos lisados diretamente nas reações de PCR.

Avaliação da estabilidade dos padrões de ribotipagem em colônias suspensas em água

A partir da cultura de duas amostras (Pa. 01 e Pa. 02) crescidas em placas de BAB, foram realizadas reações de amplificação utilizando 2, 4, 6 e 10 unidades formadoras de colônias (UFC) suspensas em 20µl de água deionizada estéril. As suspensões foram fervidas por 10 minutos em banho-maria e 10µl dos lisados aplicados diretamente nas reações de PCR.

Resultados e discussão

O polimorfismo do padrão de restrição do rDNA tem sido usado para tipagem de várias espécies de bactérias patogênicas, mas seu poder discriminatório varia de espécie para espécie. Em *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica* é altamente discriminatória [22, 23], mas não tem capacidade discriminatória em *Salmonella* [24]. Em *P. alcalifaciens* é indicado como um método sensível para investigações epidemiológicas [15].

Neste estudo, um total de 72 amostras de *P. alcalifaciens* foram analisadas através da técnica de Ribotipagem-PCR utilizando um par de “primers” desenhados para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S do rRNA [20].

Inicialmente foi realizada a ribotipagem com o DNA genômico extraído de seis amostras. Os padrões de amplificação revelaram-se muito polimórficos, quanto ao tamanho e ao número de segmentos (bandas) amplificados. Observou-se a amplificação de três a sete bandas de tamanho variando entre 500 a 1600 pb (Figura 1). Os diferentes perfis permitiram a distribuição das culturas em cinco ribotipos (Tabela 1).

A ribotipagem por PCR, apesar de mais simples e de mais fácil execução que a ribotipagem que emprega o perfil de restrição, ainda é uma técnica trabalhosa quando é realizada a partir do DNA extraído das culturas. Alguns trabalhos mostram que a amplificação diretamente de culturas crescidas em caldo, e em colônias crescidas nas placas e suspensas em água é factível [25, 26].

Visando simplificar a técnica e diminuir seu custo para analisar maior número de amostras, foi realizado um ensaio para verificar a possibilidade de realizar as reações diretamente das culturas crescidas em caldo em seis amostras. Não houve amplificação em nenhuma das amostras, possivelmente pela ação

impediente exercida pelo meio de cultura, visto que a PCR pode ser inibida por constituintes do meio de cultura ou por componentes presentes no material biológico [27].

Em contrapartida, nos ensaios realizados diretamente das colônias crescidas em placas houve amplificação a partir dos diferentes números de colônias (2, 4, 6 e 10 colônias) de uma mesma cultura, nas duas amostras (Pa. 1 e Pa. 2) e os padrões de amplificação foram similares (Figura 2). O padrão de amplificação obtido na reação com quatro colônias foi considerado o mais satisfatório por apresentar maior nitidez e clareza dos fragmentos amplificados favorecendo a análise das bandas amplificadas. Foi observado que a PCR se torna mais específica em presença de concentrações adequadas do DNA molde, enquanto que, a presença de elevadas concentrações de DNA tende a diminuir a especificidade da reação.

Com esses resultados foram usadas quatro colônias de cada cultura para ribotipagem das 72 amostras. Nas amplificações obtidas diretamente das colônias, observou-se amplificação de uma a sete bandas de tamanho variando entre 450 a 1800 pb. Com base nos seus respectivos padrões de amplificação, as 72 amostras foram classificadas em 34 ribotipos. A Tabela 1 mostra a distribuição das amostras em cada ribotipo e a Figura 3 (a, b) mostra um gel de agarose representativo dos 34 ribotipos.

Estes resultados confirmam a grande heterogeneidade genética de *P. alcalifaciens*, demonstrada anteriormente em outros estudos que descrevem perfis plasmidiais muito heterogêneos, desde cepas sem plasmídeos a cepas com cinco plasmídeos, um polimorfismo no padrão de RAPD-PCR [11] e uma heterogeneidade de ribotipos através da análise combinada de padrões de ribotipagem obtidos com diferentes enzimas de restrição [14, 15].

Em contraste com esta heterogeneidade, foi observada grande homogeneidade através de PFGE em culturas isoladas de um surto de infecção alimentar no Japão [7]. Esta diferença deve-se ao fato que as culturas analisadas no presente estudo

e por outros autores terem sido isoladas de casos esporádicos de gastroenterite. Por outro lado, a análise genética dos isoladas de casos esporádicos revela uma relação clonal entre as culturas que apresentam capacidade invasiva indicando a existência de clones específicos responsáveis pela propriedade invasiva que são distribuídos endemicamente nas populações estudadas [11, 14].

Em conclusão, as 72 amostras analisadas neste trabalho apresentaram grande diversidade genética com padrões de amplificação muito polimórficos. A ribotipagem por PCR demonstrou uma grande capacidade discriminatória em *P. alcalifaciens* e simplicidade na execução, podendo ser realizada diretamente de colônias crescidas em placas de BAB. Esses dados apontam a eficácia da técnica como ferramenta epidemiológica para *P. alcalifaciens*.

Referências

1. Sen R. Isolation of strains of *Providencia* group from cases with diarrhoea in Ibadan, Nigeria, West Africa. *Indian J Med Res* 1962; **50**:622-626.
2. Albert MJ, Faruque AS, D. Mahalanabis. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:1433-1435.
3. Guth BEC, Perrella E. Prevalence of invasive ability and other virulence-associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol* 1996; **45**:459-462.
4. Magalhães V, Leal NC, Melo VM, Sobreira M, Magalhães M. Invasion of HeLa cells by *Providencia alcalifaciens* presumably is plasmid-encoded. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**:767-768.
5. Penner JL. Genus XII. *Providencia* Ewing 1962. In N.R. Krieg & J.G. Holt (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Baltimore. 1984: 494-496.
6. Haynes J, Hawkey PM. *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. *Br Med J* 1989; **299**:94-95.
7. Murata T, Iida T, Shiomi Y, Tagomori K, Akeda Y, Yanagihara I, Mushiake S, Ishiguro F, Honda T. A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Infectious Diseases*. 2001; **184**:1050-1055.
8. Albert MJ, Alam K, Ansaruzzaman M. *et al.* Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhoea. *Infect Immun* 1992; **60**:5017-5024.
9. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Neogi PK, Faruque AS. Characteristics of invasion of HEp-2 cells by *Providencia alcalifaciens*. *J Med Microbiol* 1995; **42**:186-190.
10. Mathan MM, Mathan VI, Albert MJ. Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens* *J Pathol* 1993; **171**:67-71.
11. Sobreira M, Leal NC, Magalhães M, Guth BEC, Almeida AMP. Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens*. *J Med Microbiol* 2001; **50**:29-34.

12. Ewing WH, Davis BR, Sikes JV. Biochemical characteristics of *Providencia*. *Public Health Lab* 1972; **30**:25-28.
13. Picard B, Picard-Pasquier N, Krishnamoorthy R, Goulet P. Correlation between DNA polymorphism and enzyme polymorphism argues in favour of the delineation of two species within *Providencia alcalifaciens*. *Res Microbiol* 1991; **142**:965-969.
14. Guth BEC, Irino K, Trabulsi LR. Clonal structure of *Providencia alcalifaciens* strains isolated from diarrhoeal stools in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol* 1999; **48**:205-209.
15. Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PAD, Giammanco G. Molecular characterization of genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:2840-2847.
16. Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1998; **137B**:165-175.
17. Ibrahim A, Goebel BM, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1993; **114**:173-178.
18. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:2557-2564.
19. Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:2082-2087.
20. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**:2202-2208.
21. Maniatis T, Fritschy EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982: 368-369.

22. Chetoui H, Delhalle E, Osterrieth P, rousseaux D. Ribotyping for use in study molecular epidemiology of *Serratia marcescens*: comparison with biotyping. *J Clin Microbiol*. 1995; **33**:2637-2642.
23. Iteman I, Guiyoule A, Carniel E. Comparisson of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J Med Microbiol* 1996; **45**:48-56.
24. Liebisch B, Schwarz S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *J Med Microbiol* 1996; **44**:52-59.
25. Graf J. Diverse restriction fragment length polymorphisms patterns of PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. . *J Clin Microbiol* 1999; **37**:3194-3197.
26. Gruner E, Felpp M, Gabathuler U, Thong KL, Altwegg M. Outbreak of typhoid fever in a non-endemic area: comparision of molecular typing methods. *J Microbiol Methods* 1997; **28**:179-185.
27. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples microbial diagnostic assays and DNA-extractions solutions. *Int J Food Microbiol* 1992;**17**:27-45.

Tabela 1. Distribuição das amostras de *Providencia alcalifaciens* nos diferentes ribotipos.

Ribotipos (R)	<i>Providencia alcalifaciens</i>
R1	Pa. 01*, Pa. 02*
R2	Pa. 03*, Pa. 07, Pa. 08
R3	Pa. 05*, Pa. 09
R4	Pa. 04*
R5	Pa. 06*
R6	Pa.10
R7	Pa. 11
R8	Pa. 12
R9	Pa.13, Pa.14, Pa. 15
R10	Pa. 16
R11	Pa. 17, Pa. 18, Pa. 19, Pa. 20, Pa. 21, Pa. 22, Pa. 41
R12	Pa.23, Pa. 24, Pa.25
R13	Pa. 26
R14	Pa. 28, Pa. 29, Pa.30
R15	Pa. 31, Pa.32, Pa.33, Pa. 34, Pa.35
R16	Pa. 36
R17	Pa. 37
R18	Pa. 38
R19	Pa. 39
R20	Pa. 40
R21	Pa. 42, Pa. 48, Pa. 52
R22	Pa. 44
R23	Pa. 45, Pa.47
R24	Pa. 46
R25	Pa. 49, Pa.50, Pa. 51, Pa. 53
R26	Pa. 55, Pa. 56, Pa.58, Pa. 59
R27	Pa. 57
R28	Pa. 60
R29	Pa. 61
R30	Pa. 62, Pa.68, Pa. 71, Pa. 72, Pa. 75
R31	Pa. 63, Pa.64
R32	Pa. 65, Pa.67, Pa. 69 e Pa. 74
R33	Pa. 66
R34	Pa. 70, Pa.73

*- Amostras analisadas a partir do DNA extraído e diretamente das colônias crescidas em placas.

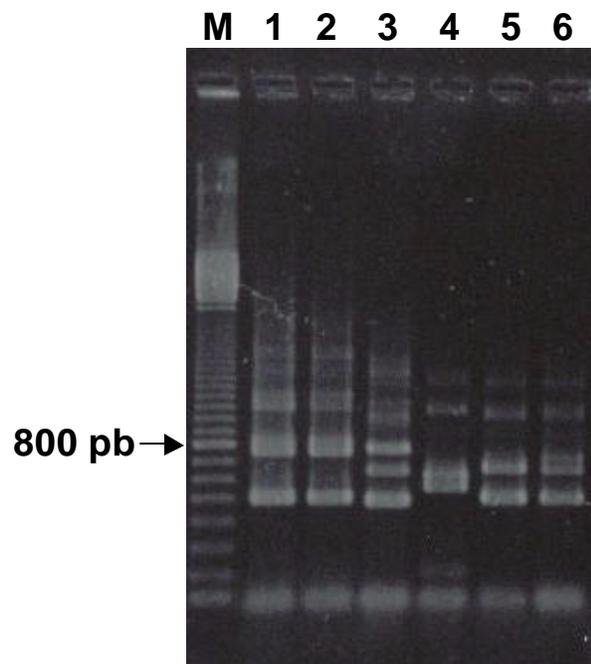


Figura 1. Gel de agarose 1,5% das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR a partir do DNA extraído das amostras de *Providencia alcalifaciens*. Linhas, **M**: DNA-ladder 100 pb; **1**: Pa. 01; **2**: Pa. 02; **3**: Pa. 03; **4**: Pa. 04; **5**: Pa. 05; **6**: Pa. 06.

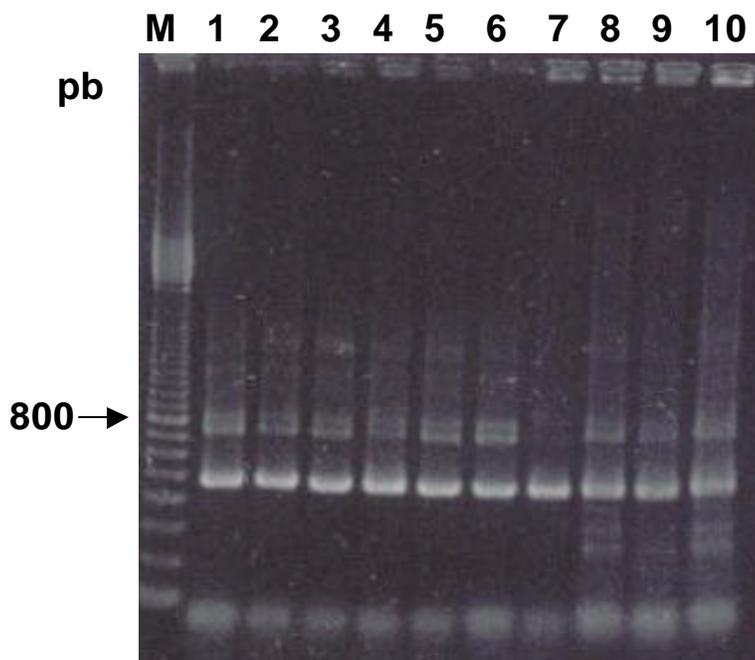


Figura 2. Gel de agarose 1,5% das amplificações geradas por Ribotipagem-

PCR a partir do lisado de colônias retiradas do meio sólido e suspensas em água das amostras de *Providencia alcalifaciens*. Linhas, **M**: “100pb DNA Ladder”; **1**: Pa. 01 (DNA); **2**: Pa. 01 (2 col.); **3**: Pa. 01 (4 col.); **4**: Pa. 01 (6 col.); **5**: Pa. 01 (10 col.); **6**: Pa. 02 (DNA);

7: Pa. 02 (2 col.); 8: Pa. 02 (4 col.); 9: Pa. 02 (6 col.); 10: Pa. 02 (10 col.).

Figura 3. (a, b). Géis de agarose 1,5% representativo das amplificações geradas por Ribotipagem-PCR de cepas de *Providencia alcalifaciens*. Linha, M: “100pb DNA Ladder”; (a)- Linhas, 1: Pa. 01; 2: Pa. 03; 3: Pa. 04; 4: Pa. 05; 5: Pa. 06; 6: Pa. 10; 7: Pa. 11; 8: Pa. 12; 9: Pa. 13; 10: Pa. 16; 11: Pa. 17; 12: Pa. 18; 13: Pa. 19; 14: Pa. 20; 15: Pa.

21. (b)-

Linhas,

1: Pa.

22; 2:

Pa. 23;

3: Pa.

24; 4:

Pa. 26;

5: Pa.

28; 6:

Pa. 29;

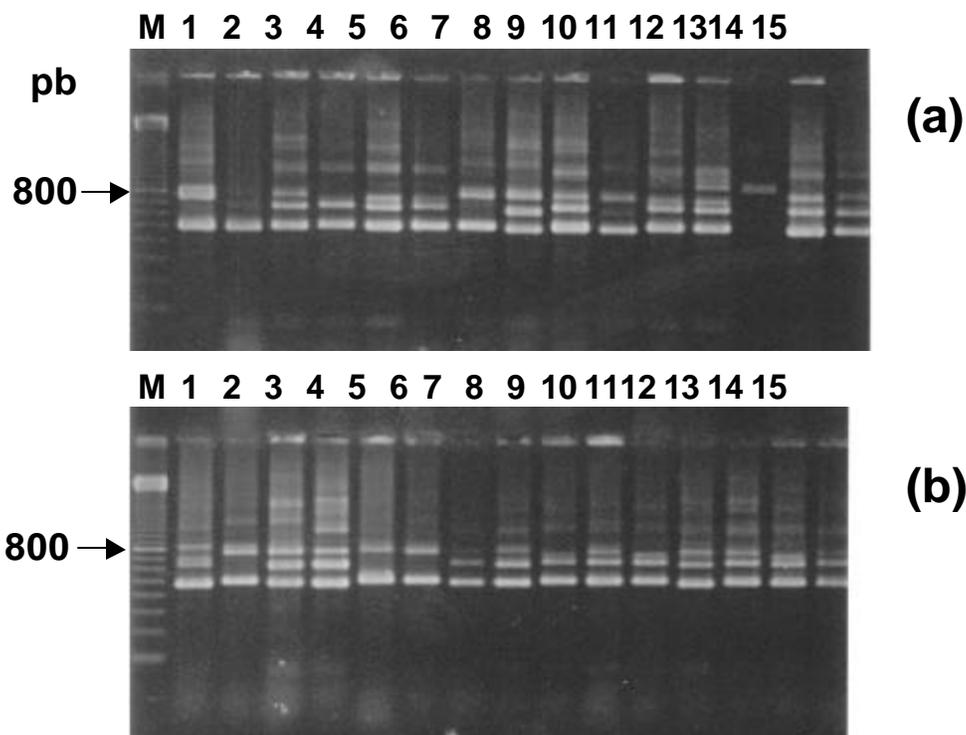
7: Pa.

33; 8:

Pa. 34;

9: Pa. 35; 10: Pa. 36; 11: Pa. 37; 12: Pa. 38; 13: Pa.

39; 14: Pa. 40; 15: Pa. 41.



ARTIGO III

Análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em amostras de yersínias patogênicas

Marise Sobreira^{1,2}, Nilma Cintra Leal¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹

1. Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/MS, Recife- PE Brasil
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE Brasil

Palavras chave: *Yersinia*; rRNA; tRNA; ribotipagem-PCR.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:
Journal of Clinical Microbiology (Washington, DC)

ANÁLISE DA REGIÃO ESPAÇADORA INTERGÊNICA DO rRNA 16S-23S EM AMOSTRAS DE YERSÍNIAS PATOGÊNICAS

M. Sobreira, N.C. Leal, A.M.P. Almeida.

Resumo

O gênero *Yersinia* contém três espécies patogênicas para animais e humanos: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. As duas primeiras são altamente relacionadas, sob o aspecto genético, sendo consideradas uma única espécie genômica, enquanto que *Y. enterocolitica* é mais divergente. “Primers” descritos para seqüências conservadas das regiões do terminal 3’ do rDNA 16S e 5’ do rDNA 23S foram utilizados para amplificar as regiões espaçadoras intergênicas dessas espécies. As culturas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* analisadas exibiram o mesmo perfil de amplificação. Os “amplicons” obtidos foram analisados através das técnicas de sequenciamento e perfil de restrição. As seqüências de nucleotídeos dos “amplicons” das duas espécies, demonstraram um elevado índice de similaridade exibindo os mesmos tipos e números de tRNAs; a clivagem dos “amplicons” com a enzima *Alu* I, demonstrou um polimorfismo entre elas, indicando que apesar da similaridade observada quanto ao número e tipos de tRNAs, codificados estas duas espécies apresentam variação nas regiões espaçadoras do rRNA 16S-23S. Por outro lado, as amostras de *Y. enterocolitica* analisadas mostraram quatro perfis de ribotipagem distintos, evidenciando um polimorfismo genético. Estes dados reforçam a identidade genética observada entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* e a relacionam à evolução de *Y. pestis*, que supõe-se ser, um clone derivado de *Y. pseudotuberculosis*.

Introdução

O gênero *Yersinia*, membro da família Enterobacteriaceae, contém 11 espécies, das quais três são patógenos humanos: *Y. pestis*, agente causador da peste bubônica; *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que são enteropatógenos. A patogenicidade nestas três espécies é mediada por um plasmídeo comum o pYV (~70 kb) (6). Além deste as cepas típicas de *Y. pestis* abrigam mais dois plasmídeos de virulência: o pFra (100 kb) e o pPst (9,5 kb) (22).

A peste é uma doença primariamente de roedores e a transmissão se dá através da picada de pulgas infectadas. O homem contamina-se acidentalmente, ao entrar em contato com os roedores ou outros animais infectados e suas pulgas. Três grandes pandemias bem caracterizadas foram registradas durante a era Cristã. A primeira pandemia, denominada "Peste de Justiniano" (542-602 d.C) teve início na África Central se estendeu para o Egito e estima-se que chegou a matar 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia ou Peste Negra, iniciou na Ásia e estendeu-se por toda a Europa e parte do Norte da África, persistiu do século XIV ao século XVIII e matou um quarto da população européia. A terceira pandemia ou pandemia Contemporânea, teve início na China estendendo-se para Hong Kong em 1894 e de lá se espalhou para todos os continentes, através do transporte marítimo (22).

No Brasil, a peste chegou em 1899, inicialmente infectou várias cidades litorâneas, de onde foi eliminada através de medidas sanitárias adequadas e focalizou-se entre os roedores silvestres, na área rural, principalmente na região Nordeste permanecendo até o presente (27, 28).

Y. pestis, caracteriza-se por apresentar um baixo número de reações bioquímicas positivas e uma grande homogeneidade, com um único sorotipo, um fagotipo, e três biovar ou variedades geográficas: Antiqua, Medievalis e Orientalis, que se distinguem pela capacidade de fermentar o glicerol e de reduzir o nitrato a nitrito; cada variedade foi considerada remanescente da primeira, segunda e terceira pandemias, respectivamente (4). A homogeneidade observada na *Y. pestis* surpreende pelo fato desta bactéria adaptar-se a diferentes tipos de

hospedeiros (roedores, homem), diversas espécies de pulgas, bem como diferentes regiões geográficas (4).

Resultados de hibridização de DNA-DNA (3) mostraram que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são fortemente relacionadas por apresentarem mais de 90% de homologia, contra apenas 48% entre essas duas espécies e *Y. enterocolitica*. Em virtude destas semelhanças foi proposto que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* fossem reclassificadas em uma só espécie com duas subespécies (3). Entretanto, devido às diferenças quanto ao modo de transmissão, quadro clínico, nível de patogenicidade e de biossegurança a separação das duas espécies foi mantida. A comparação de seqüências de genes homólogos como os genes do rRNA 16S e genes reguladores e estruturais do lipopolissacarídeo (LPS), de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* revelam uma similaridade na seqüência de nucleotídeos de 97 a 99,7% (1, 12). Esses resultados sugerem que *Y. pestis* é um clone de uma cepa de *Y. pseudotuberculosis*, provavelmente sorotipo O:1b, que surgiu entre 1.500 a 20.000 anos atrás (1, 25). A razão das diferenças na virulência dessas duas espécies vem sendo alvo de muitos estudos; vários genes presentes nas duas espécies estão ativos em *Y. pseudotuberculosis* mas, mutados em *Y. pestis* (24, 25).

Entretanto, estudos recentes mostram que *Y. pestis* não é totalmente uniforme, o seu genoma é rico em seqüências de inserção (IS) que favorecem mutações através de deleções das ISs além de integração dos plasmídeos ao cromossoma, indicando freqüentes recombinações intragenômicas (20). Análises do perfil de restrição com a localização dos genes de IS 100 (1) e do rRNA, revelam uma variabilidade relacionada com as três variedades geográficas (8). Com base no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes do rRNA, foram inicialmente identificados 16 ribotipos distintos em amostras de *Y. pestis* de diferentes focos do mundo (8). Posteriormente foi detectada a emergência de quatro novos ribotipos que surgiram recentemente durante um surto de peste na Índia (1 ribotipo), e outros três que surgiram em anos diferentes durante o atual surto de peste em Madagascar (9), sugerindo que perfis distintos do gene do rRNA podem se desenvolver em um curto período de tempo (menos de meio

século), em uma área geográfica específica. As regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), especialmente as que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolucionária, logo apresentam uma maior variação genética que as regiões que codificam o rRNA (5).

Nosso objetivo foi investigar o polimorfismo das ISRs de amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* e analisar amostras de *Y. pestis* de diferentes períodos epidemiológicos para verificar se a necessidade de adaptação aos diversos hospedeiros (homem, várias espécies de roedores e pulgas) nos diferentes focos brasileiros, teve alguma influência sobre a evolução de *Y. pestis* no Brasil.

Materiais e Métodos

Bactérias e condições de cultivo. Para este trabalho foram utilizadas 35 cepas de *Y. pestis* dos focos de peste do Nordeste do Brasil isoladas de casos humanos, de diferentes espécies de pulgas e de roedores, no período de 1966 a 1997, oito cepas originadas de outros países (Tabela 1), duas cepas de *Y. pseudotuberculosis* (YP 1553 O:6, YP 2944 O:3) e nove cepas de *Y. enterocolitica* (Tabela 2).

As culturas foram reativadas pelo semeio em caldo (Brain Heart Infusion broth, Difco: BHI) incubadas a 28°C por 48 horas e em seguida plaqueadas em meio gelose (Blood Agar Base, Difco: BAB). A identificação e a pureza das culturas de *Y. pestis* foram confirmadas pela sensibilidade ao fago antipestoso (2).

Testes de fermentação do glicerol e redução do nitrato. Para verificar a capacidade de fermentar o glicerol e reduzir o nitrato a nitrito das culturas de *Y. pestis*, 100 µl de cultura em BHI, crescida a 28 °C por 24 horas, foi inoculado em caldo (Phenol red broth, Difco) contendo glicerol (1%), incubado a 28°C por sete dias, e em caldo (Nutrient broth, Difco) contendo nitrato de potássio (KNO₃ 1%), incubado a 28°C por 72 horas (2).

Extração do DNA genômico. O DNA genômico das culturas foi extraído segundo protocolo baseado em Maniatis *et al.* (18) e quantificado após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando para comparação uma quantidade conhecida do DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III.

Amplificação das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes do rRNA 16S-23S. Foram utilizados dois conjuntos de “primers” desenhados com base nas seqüências complementares das regiões conservadas dos genes dos rRNAs 16S e 23S de várias espécies bacterianas (10). Os “primers”: 5'-TTGTACACACCGCCCGTA-3' e 5'-GGTACCTTAGATGTTTCAGTTA-3' (14), foram utilizados nas ampliações com o DNA de todas as amostras. Outro par de “primers” (5): 5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3' (região sublinhada

indica um sítio de restrição para *Pst*I) e 5'-ACGAATTCTGACTGCCMRGGCATCA-3' (região sublinhada indica um sítio de restrição para *Eco*RI), foi utilizado para amplificar as ISRs para posterior sequenciamento.

As reações foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, contendo 20ng de DNA genômico, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl (pH8,0), 0,16mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-Pharmacia), 1,5mM de MgCl₂, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) e 20pmol de cada “primer”, nas reações com os “primers” descritos por Kostman *et al.* (14) e submetidas à amplificação em um termociclador (Perkin Elmer) programado para 30 ciclos segundo descrito por Pereira *et al.*, (2002). Nas reações com os “primers” descritos por Chun *et al.* (5) foram utilizados 40 pmol de cada “primer” e os demais componentes nas concentrações descritas anteriormente, as reações foram realizadas em um termociclador (Biometra) programado para uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 30 ciclos correspondendo cada ciclo as etapas de: desnaturação do DNA por 1 minuto a 94°C, seguida do anelamento de 1 minuto a 50°C e alongamento de 1,5 minuto a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato e voltagem constante de 100V, corados com brometo de etídio (15 mg/ml) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado o “100 base-pair DNA ladder” (Amersham Pharmacia Biotec).

Clivagem dos produtos de amplificação das ISRs. Os produtos de amplificação do DNA das culturas de *Y. pestis* P. CE 882; P. EXU 384, EV 76, PKR 684, da YP 2944 (*Y. pseudotuberculosis*) e da Ye 40 (*Y. enterocolitica*) com o conjunto de “primers” descrito por Kostman *et al.* (14), foram purificados com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), precipitados com etanol (100%) à -20°C por 30 minutos, quantificados nas condições descritas anteriormente, e em seguida clivados com as enzimas *Alu* I, *Hpa* II, *Msp* I e *Mbo* I em tampões recomendado pelo fabricante (Amersham Pharmacia Biotec), a 37°C por 24 horas.

Os produtos da clivagem foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% nas condições descritas anteriormente.

Purificação dos segmentos das ISRs amplificadas. Os segmentos das ISRs amplificadas a partir do DNA das culturas de *Y. pestis*: P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, PKR 684 e P. Peru 375, e da YP 2944 (*Y. pseudotuberculosis*) com os “primers” descritos por Chun *et al.* (5), foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, recortados do gel e purificados com o kit “Concert gel extraction systems” (Life Technologies-GIBCO BRL) conforme instruções do fabricante. Os “amplicons” das ISRs purificados das culturas PKR 684, P. Peru 375 e YP 2944, foram utilizados para sequenciamento direto, sem envolver clonagem.

Clonagem. Os “amplicons” purificados das culturas: P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, foram clivados com as enzimas PstI e EcoRI em tampão NE3 (Amersham Pharmacia Biotec) a 37°C por 12 horas e incubados por 15 minutos a 70°C, para inativar as enzimas. Os fragmentos ISRs digeridos, foram clonados em um plasmídeo vetor pré-digerido PTZ 18R (Pharmacia Biotec), e recircularizado por ação da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotec). Células competentes, *Escherichia coli* DH5 *a*, foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos contendo as diferentes ISRs, os clones recombinantes foram selecionados, em meio Agar LB IPTG-X-Gal contendo ampicilina (100 **ng** ml⁻¹), de acordo com o procedimento padrão de colônias brancas ou azuis (23). Os clones selecionados foram crescidos em caldo LB (Luria Bertani broth, Difco: LB) contendo ampicilina (100 **ng** ml⁻¹), e os plasmídeos contendo os fragmentos foram extraídos em maxi-preparações segundo Sambrook *et al.* (23) e purificados com o “kit Concert high purity plasmid purification systems” (Life Technologies-GIBCO BRL). O tamanho dos insertos foi confirmado em gel de agarose 1% após o tratamento com EcoRI - PstI.

Sequenciamento. As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos das ISRs clonados e não clonados foram determinadas empregando os “Kits Auto read sequencing” e “Thermo sequenase Cy5 Dye terminator cycle sequencing”, respectivamente (Amersham Pharmacia Biotec) em um seqüenciador automático “ALFexpress DNA sequencing” (Amersham Pharmacia Biotec). Para os fragmentos das ISRs não clonados foi empregado um dos “primers” (5'-TTTCTGCAGYGGNTGGATCACCTCCTT-3') utilizados na reação de ribotipagem por PCR.

Análise das seqüências. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando os programas de pesquisa “online” BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do Sanger Center (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Y_pestis/blastserver.shtml).

Resultados

Varietades geográficas. Das 35 cepas brasileiras de *Y. pestis* analisadas, 33 reduziram o nitrato a nitrito e não fermentaram o glicerol, sendo enquadradas na variedade Orientalis (Tabela 1). Apenas duas (P. Exu 246 e P. Exu 792) não fermentam o glicerol nem reduzem o nitrato, sendo consideradas atípicas.

Entre as oito cepas de outros países duas (PKR 684 e KIM) fermentaram o glicerol mas não reduziram o nitrato a nitrito, sendo classificadas na variedade Medievalis, e as demais foram classificadas na variedade Orientalis (Tabela 1).

Ribotipagem por PCR. Através da ribotipagem por PCR com o conjunto de “primers” descrito por Kostman *et al.* (14) as 35 cepas brasileiras e as 8 cepas estrangeiras de *Y. pestis* analisadas exibiram o mesmo perfil de amplificação, caracterizado pela presença de seis bandas medindo de 800 a > 2000 pares de base (pb) (Figura 1a). As duas cepas atípicas, glicerol negativa e nitrato negativa, (P. Exu 246 e P. Exu 792), também apresentaram o mesmo perfil de amplificação.

As cepas de *Y. pseudotuberculosis* exibiram o mesmo perfil de ribotipagem encontrado nas cepas de *Y. pestis* (Figura 1b).

As nove amostras de *Y. enterocolitica* analisadas mostraram quatro perfis de ribotipagem distintos, denominados neste estudo de Yr1 a Yr4 (Tabela 2, Figura 2). As seis cepas de um mesmo sorotipo (O:3) e igual origem (suíno), apresentaram três perfis de ribotipagem e das três cepas de origem humana de diferentes sorotipos, duas apresentaram perfil de ribotipagem semelhante e uma mostrou um perfil de ribotipagem igual ao observado em uma cepa de suíno (Tabela 2).

Com o conjunto de “primers” descrito por Chun *et al.* (5) todas as cepas de *Y. pestis* (P. EXU 788, P. EXU 792, P. CE 882, PKR 684 e P. Peru 375) e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944) analisadas também exibiram igual perfil de amplificação, caracterizado pela presença de duas bandas nítidas, uma maior que mede mais que 600 pb e outra menor medindo cerca de 550 pb (Figura 3). Adicionalmente, duas bandas fracas > 800pb foram exibidas igualmente nas duas espécies.

Perfil de clivagem. Os produtos de amplificação com os “primers” descritos por Kostman *et al.* (14) e as cepas de *Y. pestis* brasileiras (P. CE 882, P. Exu 384), e estrangeiras (EV 76, PKR 684 e KIM) de diferentes biovar e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944), clivadas com as enzimas Hpa II Msp I e Mbo I, apresentaram o mesmo perfil, sendo observado um perfil de restrição característico para cada enzima (Figura 4). A clivagem das ISRs com a enzima Alu I produziu um padrão de bandas iguais com as diferentes cepas de *Y. pestis* analisadas e padrões diferentes com as cepas de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944) e *Y. enterocolitica* (Ye 40) mostrando um polimorfismo intraespecífico (Figura 5).

Análise das seqüências. O resultado da análise das seqüências dos dois “amplicons” obtidos com os “primers” descritos por Chun *et al.* (5), demonstrou que o amplicon maior (>600 pb), designado ISR-1, resultou em seqüências de 419

a 782 nucleotídeos nas diferentes cepas analisadas (Tabela 3). Em todas as cepas de *Y. pestis* (P. EXU 788, P. EXU 792, P. EXU 882, PKR 684, P. Peru 375) e a cepa de *Y. pseudotuberculosis* (YP 2944), analisadas neste estudo a ISR-1 mostrou três genes de tRNA (tDNAs) que codificam para tRNA^{Ala(GGC)}, tRNA^{Ala(TGC)} e tRNA^{Ile(GAT)}, respectivamente, com seus anticódons indicados entre parêntesis. A ISR menor, um “amplicon” com cerca de 550 pb variou de 311 a 685 nucleotídeos de comprimento, designado ISR-2, mostrou-se igualmente invariável, apresentando em todas as cepas de *Y. pestis* e na cepa de *Y. pseudotuberculosis* um único gene de tRNA (tDNA) que codifica para a síntese do tRNA^{Glu(TTC)} (Tabela 3). A seqüência ISR-1 mostrou uma similaridade, da seqüência completa dos tRNAs^{Ala}, tRNA^{Ile} e das seqüências parciais dos genes dos rRNAs 16S e 23S, com as seqüências de diversos gêneros e espécies bacterianas, entre elas as cepas de *Y. pestis* CO92 (USA) e KIM (Iran), e *Y. pseudotuberculosis* cepa PB1/+, através do programa BLAST. A seqüência ISR-2 mostrou similaridades da seqüência completa do tRNA^{Glu} e das seqüências parciais dos genes dos rRNAs 16S e 23S, com as seqüências de diversos gêneros e espécies bacterianas, além da similaridade com as cepas de *Y. pestis* CO92, KIM e a PB1/+ (*Y. pseudotuberculosis*) mostrou similaridade também com a cepa YP 8081 (*Y. enterocolitica*).

Discussão

Os resultados das reações de fermentação do glicerol e redução do nitrato, mostraram que a maioria das amostras de *Y. pestis* brasileiras estudadas se enquadra na variedade Orientalis (G⁻, N⁺) correspondendo à cepa que se supõe ter sido disseminada durante a última pandemia (7). Duas cepas (P. Exu 246 e P. Exu 792) não se enquadram nessa variedade porque não fermentam o glicerol nem reduzem o nitrato. Esta variedade (G⁻, N⁺) também não se enquadra nas outras duas variedades (G⁺, N⁺ e G⁺, N) descritas por Devignat (1951) sendo consideradas atípicas. Esta característica (G⁻, N⁺) havia sido encontrada em outras cepas brasileiras (13) e na Birmânia (11).

Através da ribotipagem por PCR com dois conjuntos de “primers” diferentes, nenhum polimorfismo foi detectado nas regiões espaçadoras intergênicas das cepas de *Y. pestis* estudadas, brasileiras ou estrangeiras, e mesmo entre as cepas de diferentes variedades geográficas (biovar Medievalis e Orientalis). Pelo polimorfismo dos fragmentos de restrição, cepas dos três diferentes biovar se enquadram em diferentes ribotipos (8). Por ocasião do atual surto de peste em Madagascar três novos ribotipos foram descritos; essas cepas foram isoladas em diferentes anos e exibiram perfis plasmidiais e perfis genômicos de restrição específicos, sugerindo evolução do bacilo em seu ambiente natural (9).

Uma análise do perfil plasmidial das cepas de *Y. pestis* do Nordeste do Brasil mostra que a maioria apresenta os três plasmídeos típicos (pFra, pYV e pPst); entretanto, foi detectada a ausência de plasmídeos em algumas cepas e a presença de bandas de DNA adicionais. A ocorrência de bandas de DNA extras nessas cepas não foi relacionada a nenhuma característica epidemiológica relevante (15). Provavelmente as mesmas resultam de rearranjos dos plasmídeos típicos (multímeros do pPst, formas lineares do pYV e do pFra), que ocorreram durante a estocagem, após o isolamento (16).

Os padrões de bandas das ISRs gerados por PCR de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* foram idênticos reforçando a alta homologia de DNA/DNA (90%) entre estas espécies, e que as mesmas constituem uma única espécie genômica (3), apesar das diferenças existentes sob o ponto de vista clínico entre as duas espécies. Por outro lado, os quadros clínicos produzidos por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são bem mais parecidos, embora a homologia entre estas espécies seja de apenas 48%.

Y. enterocolitica é uma espécie muito heterogênea, pois existem vários biotipos, fagotipos e numerosos sorotipos. Além disso, foram encontrados variantes dentro dos sorotipos por ribotipagem (19) e por RAPD-PCR (17). As amostras de *Y. enterocolitica* estudadas neste trabalho foram agrupadas em quatro ribotipos diferentes dos encontrados nas cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Através da técnica de RAPD-PCR essas mesmas cepas haviam sido classificadas em cinco grupos genotípicos (17). Os resultados do

presente trabalho confirmam o polimorfismo genético observado, entretanto, não foi possível relacionar os perfis de ribotipagem obtidos com os perfis de RAPD-PCR.

Nenhum polimorfismo foi detectado no perfil de clivagem das ISRs das diferentes cepas de *Y. pestis* brasileiras e estrangeiras de diferentes biovar e a cepa de *Y. pseudotuberculosis*, com as enzimas *Hpa* II *Msp* I e *Mbo* I. A clivagem dos produtos de amplificação das ISRs com a enzima *Alu* I, utilizada neste estudo, produziu padrões diferentes, possibilitando a diferenciação interespecífica entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Outros estudos que avaliam os padrões de restrição de *Eco*RI dos genes de rRNA de cepas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* também apontam esta diferenciação (8).

A seqüência do rDNA 16S mostra-se altamente conservada nas diversas espécies de yersínias (12). Entretanto, foi descrita uma região de variabilidade intergenérica e duas regiões de variabilidade intragenérica. Embora não tenha sido observada variação entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* para esta região, foi demonstrada uma variação de uma base na região variável do rDNA 23S destas duas espécies (26).

Os genes de tRNA nas ISR-1 e ISR-2 variaram em número e tipo do tRNA codificados caracterizando a ocorrência de tipos distintos de operons de rRNA que ocorrem igualmente em *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. As seqüências de nucleotídeos das ISRs das duas espécies demonstraram um elevado índice de similaridade exibindo os mesmos tipos de tRNAs, corroborando com a hipótese de que *Y. pestis* é um clone de *Y. pseudotuberculosis* que evoluiu recentemente, e que ainda compartilha muitas seqüências homólogas com *Y. pseudotuberculosis* (1). Entretanto, a clivagem dos “amplicons” das ISRs das amostras destas duas espécies, com a enzima *Alu* I demonstrou um polimorfismo entre elas, indicando que apesar da similaridade observada quanto ao número e tipos de tRNAs codificados nas ISRs estas duas espécies apresentam uma variação ao nível de ISR, correspondendo a uma relação de conservação ou perda de sítios de restrição para a enzima *Alu* I nos operons do rRNA de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, o que pode caracterizar uma microevolução entre elas.

Apenas a banda ISR-2 mostrou similaridade com as três espécies patogênicas do gênero, enquanto que a banda ISR-1 apresentou homologia com cepas de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, mas não com cepas de *Y. enterocolitica*. A similaridade de ISR-1 e ISR-2, demonstrada entre *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* reforça a identidade genética observada nestas duas espécies e sugere que ISR-1 pode ser mais um candidato a maiores investigações para ser usado como ferramenta epidemiológica para acompanhar a evolução de surtos de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*.

A similaridade observada entre as amostras de *Y. pestis*, de diversos focos, origens e períodos de isolamento, analisadas neste estudo reflete a natureza clonal desta bactéria, característica de muitos patógenos que sofrem elevadas pressões seletivas.

Referências

1. **Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 96:14043-14048.
2. **Bahmanyar, M., and D.C. Cavanaugh.** 1976. Plague Manual. World Health Organization, p.76.
3. **Bercovier, H., H.H. Mollaret, J.M. Alonso, J. Brault, G.R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and relationship to *Y. pseudotuberculosis*. Curr. Microbiol. 4:225-229.
4. Carniel, E., and H.H., Mollaret. **1990. Yersiniosis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 13: 51-58.**
5. **Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwel.** 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol. 65:2202-2208.
6. **Cornelis, G.R.** 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 97:8878-8783.
7. **Devignat, R.** 1951. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. Bull. Wld. Hlth. Org. 4:247-263.
8. **Guiyoule, A., F. Grimont, I. Itean, P.A.D. Grimont, M. Lefèvre, and E. Carniel.** 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis*. J. Clin. Microbiol. 32:634-641.
9. **Guiyoule, A., B. Rasoamanana, C. Buchrieser, P. Michel, S. Chanteau, and E. Carniel.** 1997. Recent emergence of new variant of *Yersinia pestis* in Madagascar. J. Clin. Microbiol. 35:2826-2833.
10. **Grimont, F. and P.A.D. Grimont.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 137B:165-175.
11. **Hudson, B.W., and T.J. Quan.** 1975. Eletrophoretic studies of the *Yersiniae*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24:968-973.

12. **Ibrahim, A., B.M. Goebel, W. Liesack, M. Griffiths, and E. Stackebrandt.** 1993. The phylogeny of genus *Yersinia* based on 16S sequences. FEMS Microbiol. Lett. 114:173-178.
13. **Karimi, Y., C.R. Almeida, A.M.P. Almeida, A. Keyvanfar, and M. Bourdin.** 1974. Particularités des souches de *Yersinia pestis* isolées dans le nord-est du Brésil. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. 125 A:243-246.
14. **Kostmam, J.R., T.D. Edlind, J.J. LiPuma, and T.L. Stull.** 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J. Clin. Microbiol. 30: 2082-2087.
15. **Leal, N.C., A.M.P. Almeida, R.C.L. Farias, M. Sobreira, T.C.A. Leal, and L.C.S. Ferreira.** 1997. Plasmid profiles of *Yersinia pestis* strains isolated in Northeast Brazil. Rev. Microbiol. 28:40-45.
16. **Leal, N.C., M. Sobreira, T.C.A. Leal, and A.M.P. Almeida.** 2000. Homology among extra-cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. Braz. J. Microbiol. 31:20-24.
17. **Leal, T.C.A., N.C. Leal, and A.M.P. Almeida.** 1999. RAPD-PCR typing of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) O:3 serotype strains isolated from pigs and humans. Genetics Mol. Biol. 22:315-319.
18. **Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
19. **Mendoza, M.C., R. Alzugaray, E. Landeras, and M.A. González-Hevia.** 1996. Discriminatory power and application of ribotyping of *Yersinia enterocolitica* O:3 in an epidemiological study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: 220-226.
20. **Parkhill, J., B.W. Wren, N.R. Thompson, R.W. Titball, M.T.G. Holden, M.B. Prentice, M. Sebaihia, K.D. James, C. Churcher, K.L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S.D. Bentley, K. Brooks, A.M. Cerdeño-Tárraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R.M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P.C.F. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B.G. Barrell.** 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative of plague. Nature. **413**: 523-527.

21. **Pereira, M.S.V., N.C. Leal, T.C.A. Leal, M. Sobreira, A.M.P. Almeida, J.P. Siqueira-Júnior, and G.M. Campos-Takaki.** 2002. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Lett. Appl. Microbiol. **In press**.

22. **Perry, R., and J.D. Fetherston.** 1997. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. **10**:35-66.

23. **Sambrook, J., and D. Russell.** 2001. Molecular cloning a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory.

24. **Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet.** 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at specific position in the *ureD* gene. Infect. Immun. **69**:170-176.

25. **Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervalä.** 2000. Characterization of O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene clusters of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O-1b. Mol. Microbiol. **2**:316-330.

26. **Trebesius, K., D. Harmsen, A. Rakin, J. Schmelz, and J. Heesemann.** 1998. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. J. Clin. Microbiol. **36**:2557-2564.

27. **WHO PAHO.** 1965. Plague in the Americas. Scientific Publication. **115**:44-68.

28. **WHO OMS.** 2000. Human plague in 1998 and 1999. Wkly. Epid. Recor. **75**: 338-343.

Figura 1 (a, b). Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Kostman *et al.*,1992) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia pestis*. Linha, M: “100pb DNA ladder”; **(a)**- Linhas, 1: P Exu 17; 2: P CE 21; 3: P Exu 538; 4: P Exu 554; 5: P Exu 556; 6: P Exu 789; 7: P

Exu 792;
8: P Exu 796; 9: P Exu 809;
10: DNA

do fago λ clivado com a enzima *Hind*III.

(b)-

Linhas, 1: EV76; 2: P Exu 882; 3: *Yersinia pseudotuberculosis* (YP 2944); 4: *Yersinia enterocolitica* (Ye 37).

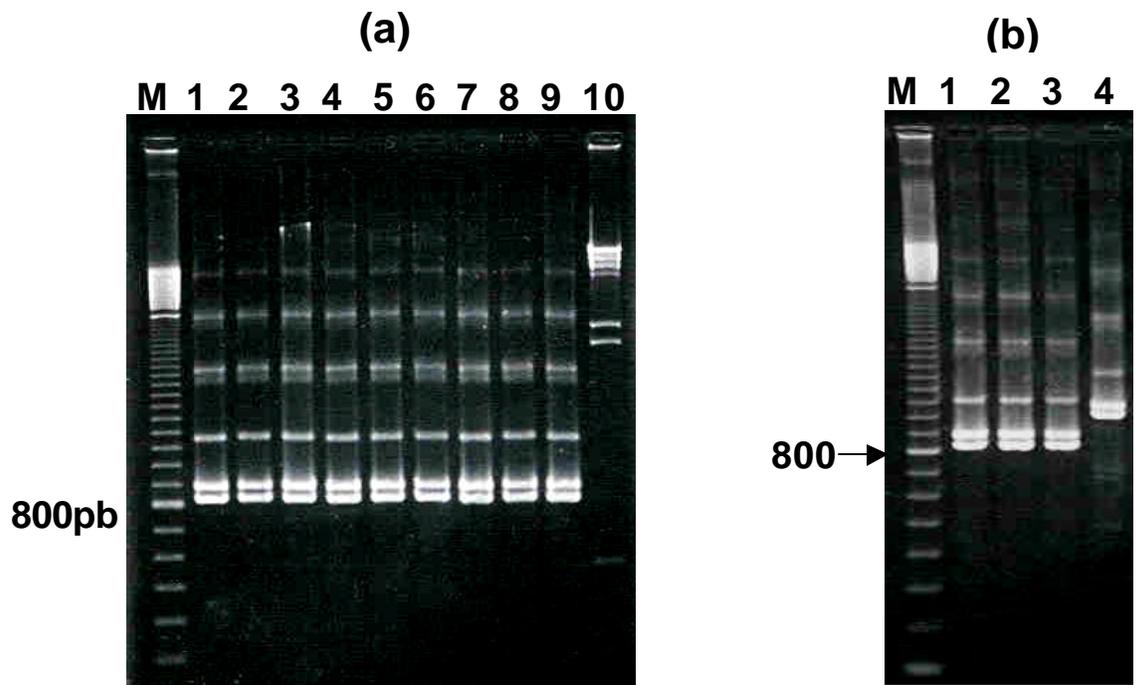


Figura 2. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Kostman *et al.*,1992) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia enterocolitica*. Linhas, M: “100pb DNA ladder”; 1: Ye 5a; 2: Ye 25L; 3: Ye 25c; 4: Ye 37; 5: Ye 40; 6: Ye 41; 7: Ye 43p; 8: Ye 102p; 9: Ye 124p.

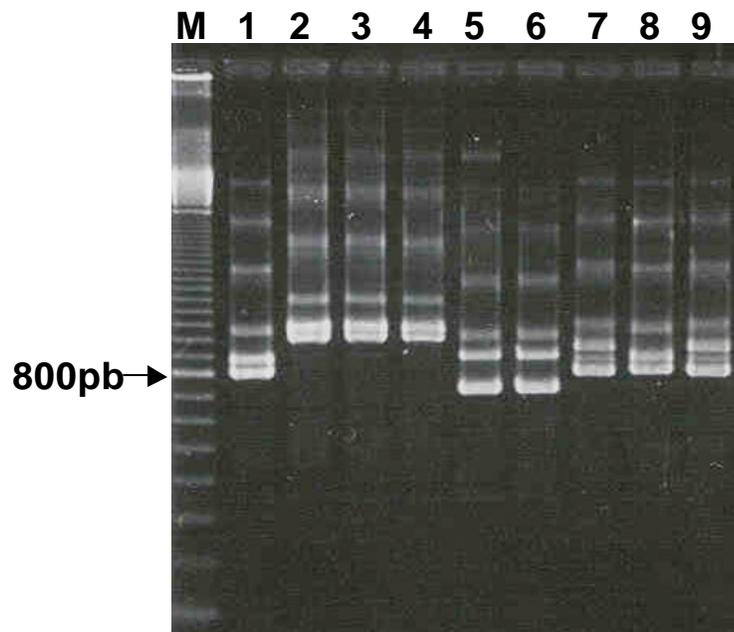
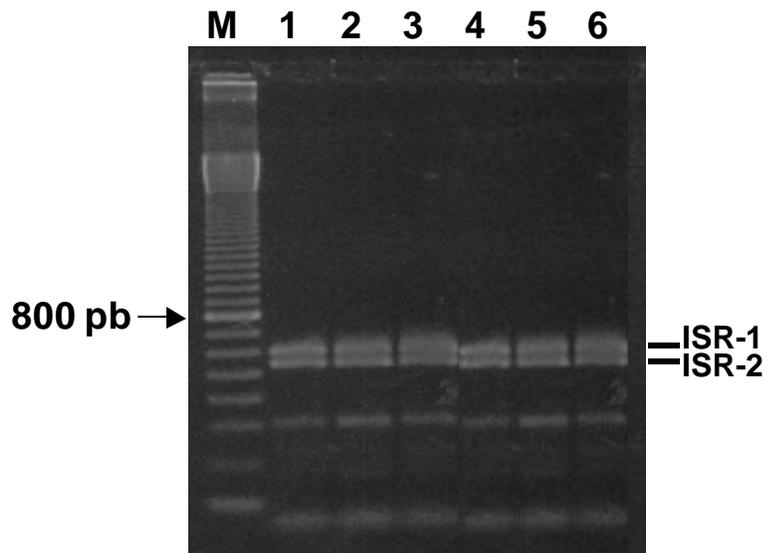


Figura 3. Gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (“primers” decritos por Chun *et al.*,1999) das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos genes rRNA 16S-23S com o DNA das cepas de *Yersinia pestis* e *Y. pseudotuberculosis*. Linhas, M: “100pb DNA ladder”; 1: P. EXU 788; 2: P.EXU 792; 3: P. EXU 882; 4: PKR 684; 5: P. Peru 375; 6: YP 2944.



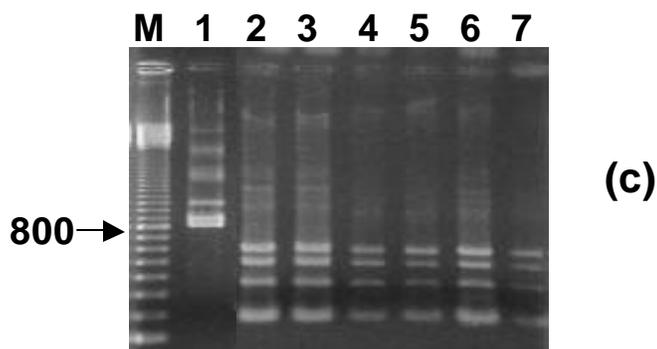
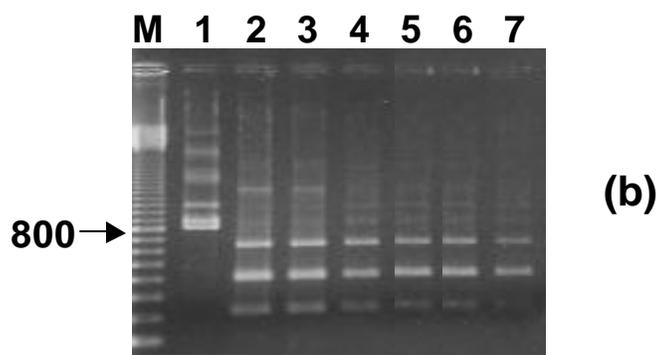
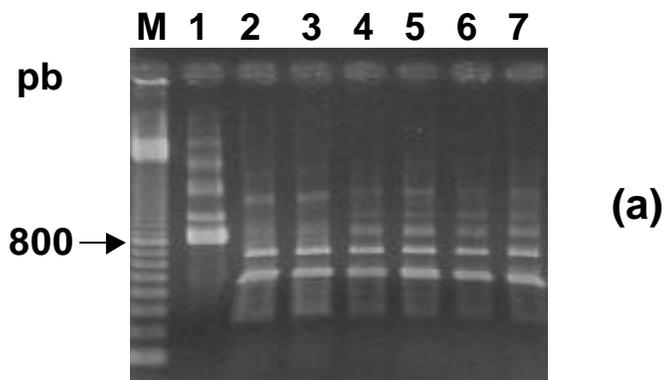


Figura 4 (a, b, c). Géis de Agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas, clivado com as enzimas *Msp* I **(a)**; *Hpa* II **(b)**; *Mbo* I **(c)**. Linhas, 1: P. CE 882 (DNA não clivado); 2: P. CE 882; 3: P. Exu 384; 4: EV 76; 5: PKR 684; 6: KIM; 7: YP 2944.

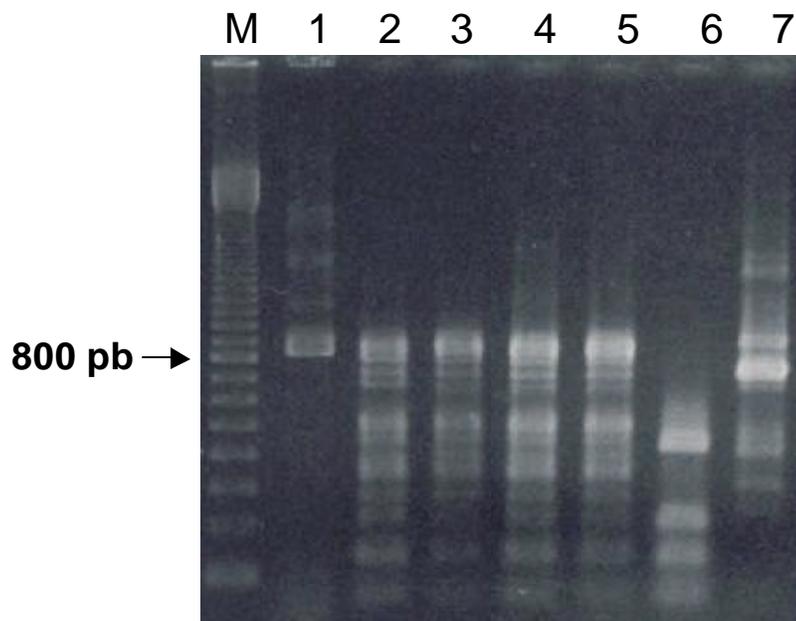


Figura 5. Gel de Agarose 1,5% dos produtos de PCR das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs), clivado com a enzima *Alu I*; Linhas, M: “100 pb DNA ladder”; 1: P. Exu 351 (DNA não clivado); 2: P. CE 882; 3: P. Exu 384; 4: P. Peru 375; 5: KIM; 6: YP 2944; 7: Ye 40.

CONCLUSÕES

A partir da análise das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) do rDNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos, conclui-se que:

1. *Staphylococcus aureus* apresenta grande polimorfismo genético, considerando o pequeno número de amostras estudadas e o número de ribotipos identificados.
2. *Providencia alcalifaciens* revelou grande heterogeneidade genética refletindo a origem das amostras estudadas obtidas de casos esporádicos, não relacionados, de gastroenterites.
3. *Y. enterocolitica* também revelou polimorfismo genético, sendo evidenciados quatro ribotipos entre as amostras estudadas.
4. *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* possuem grande homologia genômica, produziram padrões de amplificação das ISRs idênticos e igual número e tipos de tRNA.
5. A clivagem dos “amplicons” de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* com a enzima *Alu I* resultou em padrões diferentes, possibilitando a diferenciação das duas espécies o que caracteriza um microevolução entre elas.
6. A similaridade observada entre as diversas amostras de *Y. pestis* estudadas reflete a natureza clonal deste patógeno.

PERSPECTIVAS

A ribotipagem através da análise do RFLP utilizando sondas para o rRNA, além das regiões espaçadoras analisadas na ribotipagem-PCR, avalia o perfil de restrição dos genes 16S e 23S do rRNA. Como os genes de rRNA apresentam regiões muito conservadas e regiões variáveis essa técnica pode detectar um maior polimorfismo.

Assim como, a análise de restrição do DNA genômico utilizando sondas derivadas de seqüências de inserção (IS), em especial em *Y. pestis* que apresenta muitas ISs no seu genoma favorecendo recombinações intragenômicas, é utilizada para avaliar a variabilidade genética.

Visto que existe uma grande similaridade nas regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S entre as diversas amostras de *Y. pestis* estudadas. Visamos implantar a técnica de análise de restrição do DNA genômico utilizando sondas para o rRNA e para seqüências de inserção (IS 100), para avaliar o polimorfismo genético entre amostras de *Y. pestis* brasileiras e aplicar ao estudo de outras bactérias patogênicas humanas de interesse regional.

ANEXOS

The Journal of Medical Microbiology

A Journal of the Society for General Microbiology

Information for Authors

Manuscript submission: The Journal will consider manuscripts written in English, of original unpublished work in all aspects of microbiology relevant to human or veterinary medicine or dentistry. Two copies of the manuscript and good quality figures must be sent to the Editors, Journal of Medical Microbiology, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG.

Please send a disk if possible (Microsoft Word or text files, in IBM-compatible format, preferably). Authors should retain an additional copy of the manuscript and figures. Upon acceptance of a manuscript for publication, a copyright transfer form will be sent to the author(s) with the proofs. This transfer form must be signed and dated by all authors or by the senior author on behalf of all authors and returned to the publisher.

Manuscript preparation: Use double spacing throughout. Organise the manuscript in the order indicated below, with each component beginning on a separate page and with a page number typed in the upper right-hand corner of each page.

Title page: Page 1 should include: (a) the title of the article; (b) the authors' names; (c) affiliations (the name of the department, if any, institution, city and state or country where the work was done) indicating which authors are associated with which affiliations; (d) the name and address of the author to whom proofs and reprint requests are to be **sent including the street address and fax number;** and (e) running title.

Abstract: Page 2 should include the title of the article followed by the abstract. The abstract should state the purpose of the study, basic procedures, most important findings, and principle conclusions, with an emphasis on the new aspects of the study.

Text: Papers should be organised in the following format: Introduction, Materials (or patients) and Methods, Results and Discussion. Other descriptive headings and sub-headings may be used if appropriate. Every effort should be made to avoid jargon, to spell out all non-standard abbreviations the first time they are mentioned and to present the contents of the study as clearly and as concisely as possible. Please give the name and address of manufacturers of commercial products cited in the text. Be sure that all references are cited in numerical order in the text and that all tables and figures cited in the text are numbered according to the order in which they appear. Data appearing in tables or figures should be summarised, not duplicated, in the text. All data cited in the text should be checked carefully against the corresponding data in the tables to ensure that they correspond, and any names cited in the text should be checked carefully against the references to ensure that the spelling is correct. Any ambiguous symbols (e.g. the letter 'O' versus the numeral '0', the letter 'I', versus the number '1') should be identified. Acknowledgements of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study should be included at the end of the text.

References: Type references double spaced and number them consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, not alphabetically. Identify references in

the text, tables and legends by Arabic numerals in square brackets. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first mention in the text of a particular table or figure. For journal articles the following information should be included: (a) all author names (surnames followed by initials) up to six (for more than six, give first three names followed by *et al.*), (b) title of the article with the same spellings and accent marks as in the original, (c) the journal title abbreviated, (d) the year of publication, (e) the volume number and (f) the page numbers. For books, give the chapter authors, chapter title, editors of the book, title of the book (including volume and edition number), publisher's location and name, year of publication, and appropriate page numbers. Examples of the correct format are as follows:

1. Gillespie SH, Ainscough S, Dickens A, Lewin J. Phosphorylcholine-containing antigens in bacteria from the mouth and respiratory tract. *J Med Microbiol* 1996; **44**: 35–40.

2. Lindahl G, Hedén L-O, Stenberg L. Streptococcal IgA receptors. In: Korhonen TK, Mäkelä PH, Hovi T (eds) *Molecular recognition in host-parasite interactions*. New York, Plenum Press. 1992: 77–83.

'Unpublished observations' and 'personal communications' should not appear in the references. These should be inserted in parentheses in the text, and letters of permission from all individuals cited in this way should accompany the manuscript. Information from manuscripts that have been submitted for publication but not yet accepted must be cited as "unpublished observations." Manuscripts that have been accepted for publication but have not yet been published may appear in the references: include the authors, manuscript title, and name of the journal followed by 'in press' in parentheses.

Tables and Figures: Tables should be marked in the order in which they are first mentioned in the text in Arabic numerals. Every column in the table should have a clearly understandable heading. Define all abbreviations and indicate the units of measurement for all values. Indicate spaces without data in tables by Indicate footnotes to the table with the superscript symbols (*, †, ‡, §) cited in order as you read the table horizontally.

Figures should be professionally drawn and numbered with Arabic numerals. Letters, numbers and symbols should be clear throughout and should be large enough to remain legible when reduced for publication. Ensure that all spelling is correct, that there are no broken letters or uneven type, and that abbreviations used are consistent with those in the text.

Photomicrographs must include a calibration bar of appropriate length (e.g. 1mm, 0.1mm, etc.). Symbols used in micrographs should contrast with the background. Four-colour illustrations are acceptable, but the author will be required to bear the costs of their publication.

Legends should be typed double spaced and numbered with Arabic numerals corresponding to the illustration.

Studies on human subjects and animals: Experimental studies on human subjects must have been conducted in an ethical manner and manuscripts should include details of approval by appropriate research ethics committees or equivalent. Similarly, experiments involving animals must avoid distress to the animals and must have been conducted under appropriate licensing/approval arrangements, details of which should be included.

Production Process: Decisions of the Editor are final. All material accepted for publication is subject to copyediting. Authors will receive page proofs of their article before publication, and should answer all queries and carefully check all editorial changes at this

point. Authors are responsible for the scientific content of their article. Authors of all articles except Letters to the Editor and Abstracts will receive 25 free reprints. Additional reprints may be ordered directly from the publisher. An order form will be sent with the page proofs.

The original manuscript and figures will be discarded one month after publication unless the publisher is requested to return original material to the author.

The validity of the data and views expressed in journal articles are the responsibilities of authors and not of the Editors, the Society for General Microbiology, or of the Publisher.

Tabela 1. Distribuição das variedades geográficas (biovar) e ribotipos de *Yersinia pestis*.

Biovar	Reações		Distribuição geográfica	Ribotipo
	Glicerol	Nitrato		
Antiqua	+	+	África Central, Norte e Centro da Ásia, China (Manchuria), Mongólia	F a O
Medievalis	+	-	União Soviética (região do Mar Cáspio)	O e P
Orientalis	-	+	China, África do Sul, América do Sul, EUA	A a G, Q, R, S, e T

Tabela 1. Origem e características das cepas de *Yersinia pestis* estudadas.

Cepas	Origem			Reação		Biovar
	Fonte	Foco	Ano	Glicerol	Nitrato	
P. Exu 538	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 540	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 554	Humano	Ibiapaba	1971	-	+	Orientalis
P. Exu 556	Humano	Ibiapaba	1972	-	+	Orientalis
P. Exu 789	Humano	Ibiapaba	1978	-	+	Orientalis
P. Exu 792	Humano	Ibiapaba	1978	-	-	Atípica
P. Exu 809	Humano	Ibiapaba	1979	-	+	Orientalis
P. CE 21	Humano	Ibiapaba	1982	-	+	Orientalis
P. Exu 882	Humano	Ibiapaba	1997	-	+	Orientalis
P. Exu 16	Humano	Triunfo	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 17	Humano	Triunfo	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 248	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 249	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 292	Humano	Triunfo	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 351	Humano	Triunfo	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 841	Humano	Triunfo	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 185	Humano	Borborema	1967	-	+	Orientalis
P. PB 862	Humano	Borborema	1986	-	+	Orientalis
P. Exu 825	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 832	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis
P. Exu 827	Pulga	Borborema	1979	-	+	Orientalis

Continua...

Continuação

Cepas	Origem			Reação		Biovar
	Fonte	Foco	Ano	Glicerol	Nitrato	
P. Exu 15	Humano	Araripe	1966	-	+	Orientalis
P. Exu 246	Humano	Araripe	1968	-	-	Atípica
P. Exu 276	Humano	Araripe	1968	-	+	Orientalis
P. Exu 312	Humano	Araripe	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 334	Humano	Araripe	1969	-	+	Orientalis
P. Exu 384	Pulga	Araripe	1970	-	+	Orientalis
P. Exu 674	Humano	Araripe	1974	-	+	Orientalis
P. Exu 738	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 769	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 771	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 778	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 781	Humano	Araripe	1975	-	+	Orientalis
P. Exu 788	Pulga	Araripe	1977	-	+	Orientalis
P. Exu 796	Humano	Baturité	1978	-	+	Orientalis
PKR 684	Roedor	Iran	S/i	+	-	Medievalis
KIM	Humano	Iran	S/i	+	-	Medievalis
PBM5	S/i	Birmania	S/i	-	+	Orientalis
PKOL	S/i	Curdistão	S/i	-	+	Orientalis
PB 8	S/i	Birmania	S/i	-	+	Orientalis
P. Peru 375	Humano	Peru	1995	-	+	Orientalis
Alexander	Humano	USA	S/i	-	+	Orientalis
EV 76	Humano	Madagascar	1926	-	+	Orientalis

S/i: sem informação

Tabela 2. Características das cepas de *Yersinia enterocolitica* analisadas.

Cepas	Fonte	Sorotipo	RAPD-PCR (Leal et al., 1999)	Ribotipo
Ye 5a	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr1
Ye 25L	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 25c	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 37	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr2
Ye 40	Suíno	0:3	Perfil genotípico 1	Yr3
Ye 41	Suíno	0:3	Perfil genotípico 2	Yr3
Ye 43p	Humano	0:6	Perfil genotípico 1	Yr4
Ye 102p	Humano	0:5	Perfil genotípico 5	Yr1
Ye 124p	Humano	0:4	Perfil genotípico 4	Yr4

Tabela 3. Informações sobre o sequenciamento das ISR-1 e ISR-2 das diferentes cepas de *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*.

Cepas	Espécie	ISR-1		ISR-2	
		Tamanho (pb)	tRNAs	Tamanho (pb)	tRNAs
P. EXU 788	<i>Y. pestis</i>	662	tRNA ^{Ala(GGC)} tRNA ^{Ala(TGC)} tRNA ^{Ile(GAT)}	603	tRNA ^{Glu(TTC)}
P. EXU 792	<i>Y. pestis</i>	677	tRNA ^{Ala(GGC)} tRNA ^{Ala(TGC)} tRNA ^{Ile(GAT)}	685	tRNA ^{Glu(TTC)}
P. EXU 882	<i>Y. pestis</i>	NR	NR	497	tRNA ^{Glu(TTC)}
PKR 684	<i>Y. pestis</i>	782	tRNA ^{Ala(GGC)} tRNA ^{Ala(TGC)} tRNA ^{Ile(GAT)}	490	tRNA ^{Glu(TTC)}
P. Peru 375	<i>Y. pestis</i>	724	tRNA ^{Ala(GGC)} tRNA ^{Ala(TGC)} tRNA ^{Ile(GAT)}	311	tRNA ^{Glu(TTC)}
YP 2944	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	419	tRNA ^{Ala(GGC)} tRNA ^{Ala(TGC)} tRNA ^{Ile(GAT)}	500	tRNA ^{Glu(TTC)}

NR- Não realizado