

Perfil epidemiológico e caracterização molecular de *Salmonella* Typhi isoladas no Estado do Pará, Brasil

Epidemiological profile and molecular characterization of *Salmonella* Typhi strains isolated in Pará State, Brazil

Perfil epidemiológico y caracterización molecular de *Salmonella* Typhi aisladas en el Estado de Pará, Brasil

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Iami Raiol Borges
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Anderson Nonato do Rosario Marinho
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Francisco Luzio de Paula Ramos
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Melissa de Sá Oliveira dos Reis
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMO

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi é o agente etiológico da febre tifoide, doença sistêmica que ocasiona quadros de febres prolongadas juntamente com distúrbios intestinais, podendo evoluir até a perfuração intestinal. No Estado do Pará, a endemidade reflete um vasto número de surtos e de casos esporádicos em diferentes municípios. O presente estudo teve como objetivo realizar uma caracterização epidemiológica e molecular de *Salmonella* Typhi isoladas no Pará. Foram analisados quatro genes de virulência (*viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*) em 75 casos de febre tifoide com isolamento a partir de hemoculturas e coproculturas, no período de 2009 a 2011. Para averiguação de reação cruzada, foram incluídas seis espécies de outras enterobactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Panama, *Proteus mirabilis* e *Shigella flexneri*). Do total de amostras analisadas, 64% são oriundas de indivíduos do gênero masculino e 36%, do feminino, com diferença significativa entre os sexos ($p = 0,0209$). Na análise da distribuição anual dos casos de febre tifoide destaca-se a maior ocorrência em 2010, com 31 casos. A maioria destes foi detectada na hemocultura (72%) em relação à coprocultura (28%) ($p = 0,0002$). A PCR convencional, com quatro pares de *primers*, identificou corretamente *S. Typhi*, produzindo quatro bandas positivas, observadas em 100% das amostras analisadas. Na análise genética, as cepas *S. Typhi* foram altamente similares para os genes analisados, que permaneceram estáveis ao longo das análises, desde o isolamento. Desta forma, os quatro pares de *primers* apresentaram-se específicos e, deste modo, passíveis de serem utilizados na identificação e caracterização de *S. Typhi*.

Palavras-chave: *Salmonella* Typhi; Reação em Cadeia da Polimerase; Fatores de Virulência; Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A febre tifoide é uma doença sistêmica, causada pela *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, caracterizada clinicamente por febre alta, cefaleia, diarreia e dor abdominal, com elevada prevalência em regiões de precárias condições sanitárias, cuja transmissão ocorre por meio do consumo de água e alimentos contaminados^{1,2}.

Em todo o mundo estima-se, anualmente, a ocorrência de 12 a 33 milhões de casos de febre tifoide que ocasiona 600 mil mortes, com a maioria das notificações ocorrendo em países da Ásia (60%) e África (35%), onde se apresenta de forma endêmica, com epidemias esporádicas. Em países desenvolvidos, os casos verificados são geralmente "importados" por meio de indivíduos que viajam aos países onde ocorre a doença³. No Brasil, todas as regiões registram casos, com índices maiores nos estados do Norte e Nordeste brasileiro, com os Estados da Bahia (1.765) e Amazonas (1.447) apresentando o maior número de casos nos dez últimos anos⁴.

No Estado do Pará, surtos de febre tifoide têm sido frequentemente registrados e os primeiros registros da doença foram feitos por Santos et al⁵ com a notificação de 281 casos no ano de 1985. Em seguida, no final da década de 1980, ocorreram surtos nos Municípios de

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS
Rodovia BR 316, km 7, s/n°. Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: +55 (91) 3214-2297 / (91) 3214-2122
E-mail: danielarochoa@iec.pa.gov.br / danielaufpa@yahoo.com.br

Marabá e Abaetetuba, seguidos de outros relatos nos Municípios de Óbidos, em 1997, Moju, em 1999, e Anajás, em 2001, com 61, 72 e 79 casos identificados da doença, respectivamente^{6,7,8,9}. Por meio de métodos moleculares (Nested PCR) foi também possível detectar *S. Typhi* em amostras de água de poços freáticos e igarapés do Estado¹⁰. Mais recentemente, no período de 1991 a 2008 identificaram-se 835 casos de salmonelose em 43 municípios do Estado do Pará, dos quais 492 (58,9%) representaram casos de febre tifoide. Dos 47 sorotipos de *Salmonella* identificados, a *S. Typhi* foi a mais frequente, com 77,8%, demonstrando assim a importância epidemiológica da febre tifoide na região¹¹.

O método atualmente utilizado para o diagnóstico é o cultivo. Esse procedimento requer o emprego de diferentes etapas, que vão desde o isolamento até a identificação final, com o emprego de diferentes meios de cultura, demandando técnicas laboriosas e, sobretudo, tempo, até que se conclua o diagnóstico, que ainda pode resultar em falso-negativos, em função de muitos fatores interferentes que podem atuar durante o processo. A demora no diagnóstico inviabiliza a conduta terapêutica desejada, constituindo fator agravante diante da severidade clínica que alguns casos podem assumir. Uma forma de contornar esse problema é desenvolver ensaios baseados na amplificação de DNA, os quais, futuramente, poderão ter utilização rotineira, beneficiando o usuário do sistema por encurtar o tempo para o diagnóstico e pela precisão e confiabilidade na identificação do agente, facilitando a atuação das autoridades de saúde nas ações de controle do agravo^{12,13}.

Com a disseminação desses métodos, técnicas genotípicas, como a amplificação e o sequenciamento do genoma de patógenos, entre outras, têm mudado de forma significativa as oportunidades para a realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, de diagnóstico e de controle das doenças microbianas¹⁴. Esses métodos moleculares apresentam muitas vantagens sobre as técnicas convencionais. Uma das mais importantes é o poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA, que é maior quando comparados aos procedimentos fenotípicos¹⁵.

A presença de fatores de virulência, codificado por genes presentes nos microrganismos patogênicos, proporciona a aptidão de determinadas bactérias em provocar doenças¹⁶. Para um melhor dimensionamento do papel destes genes no mecanismo de patogenicidade torna-se indispensável uma total compreensão das etapas do processo infeccioso, que podem ser divididas em adesão, invasão, replicação, seguida de mecanismos que levam a resistência ao sistema de defesa, causando danos ao hospedeiro¹⁷. Estes genes de virulência podem estar presentes tanto em elementos genéticos móveis, como transposons ou plasmídeos, bem como integrar regiões específicas do material genético, cromossomo da bactéria, sendo este último denominado de ilhas de patogenicidade (IP)¹⁸.

Na *Salmonella* *Pathogenicity Island* (SP-1) foi descrito o operon *Inv* (*invasibility*) que possui em sua constituição sete genes denominados de *invABCDEFG*. O gene *invA* apresenta-se no operon como o primeiro, desempenhando papel crítico na invasão das células do epitélio. A ausência do gene *invA* em *S. enterica* leva a não expressão dos genes *invABC*, ocasionando a perda do potencial de invadir células no epitélio dos mamíferos^{19,20}. A *S. enterica* sorotipo Typhi possui fímbrias responsáveis pela adesão nas células intestinais e os lipopolissacarídeos (LPS) que proporcionam a proteção da bactéria da atuação letal das defensinas, ambos considerados fatores de virulência por suas propriedades de adesão e proteção para *S. Typhi*. A síntese do LPS é codificada por cerca de 20 genes, entre eles o gene *prt*. Porém o antígeno capsular Vi parece ser o mais importante, pela propriedade de proteger a bactéria da ação dos mecanismos de imunidade inata, tornando-a potencialmente patogênica para o hospedeiro²¹.

Dentre os isolados de *Salmonella*, em sua maioria foi observado que apenas a expressão de dois genes é responsável por codificar os antígenos flagelares, quais sejam: o gene *fliC*, responsável por codificar o antígeno de fase 1, e o gene *fljB*, responsável por codificar o antígeno da fase 2, ambos conservados no gênero. São expressos por um mecanismo de variação de fases, no qual o *fliC* é encontrado em todas as salmonelas e em *Escherichia coli*, que possui um homólogo, diferentemente do *fljB*, que se encontra apenas no genoma de *Salmonella*, podendo ser isolado em quatro das seis subespécies, com a presença do gene *fliC* estando relacionado ao aumento da virulência do patógeno *in vivo*²².

Bons resultados na vigilância epidemiológica da febre tifoide só serão possíveis por meio da admissão definitiva de testes que, além de permitirem o diagnóstico rápido da infecção e fornecerem resultados confiáveis, possam ser largamente disponibilizados. Ressalta-se que esses métodos são capazes de superar os problemas ocasionados pelas barreiras geográficas, que implicam diretamente na viabilidade do agente para o cultivo do sangue e das fezes, além de superar também o frequente problema do uso prévio de antibióticos. Assim, o objetivo desse estudo foi a identificação rápida e caracterização, por meio de métodos moleculares, de *S. Typhi* isoladas no período de 2009 a 2011 no Estado do Pará e identificar as características demográficas (sexo, idade, município de residência) e epidemiológicas (localidade provável de infecção) dos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS

Foram estudados 75 casos de febre tifoide com isolamento de *S. Typhi* a partir de hemoculturas e coproculturas, no período de 2009 a 2011, com os isolados disponíveis na Bacterioteca da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro

Chagas (IEC). O número de casos avaliados obedeceu à demanda anual da febre tifoide diagnosticada pelo IEC. Os pacientes foram constituídos de crianças e adultos procedentes de 18 municípios do Estado do Pará (Figura 1). Esta pesquisa utilizou levantamento de dados junto a prontuários para conhecer as características demográficas e epidemiológicas, os quais foram mantidos em sigilo, em conformidade com o que prevê os termos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde²³.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IEC, sob parecer n° CAAE: 04511612.9.0000.0019.

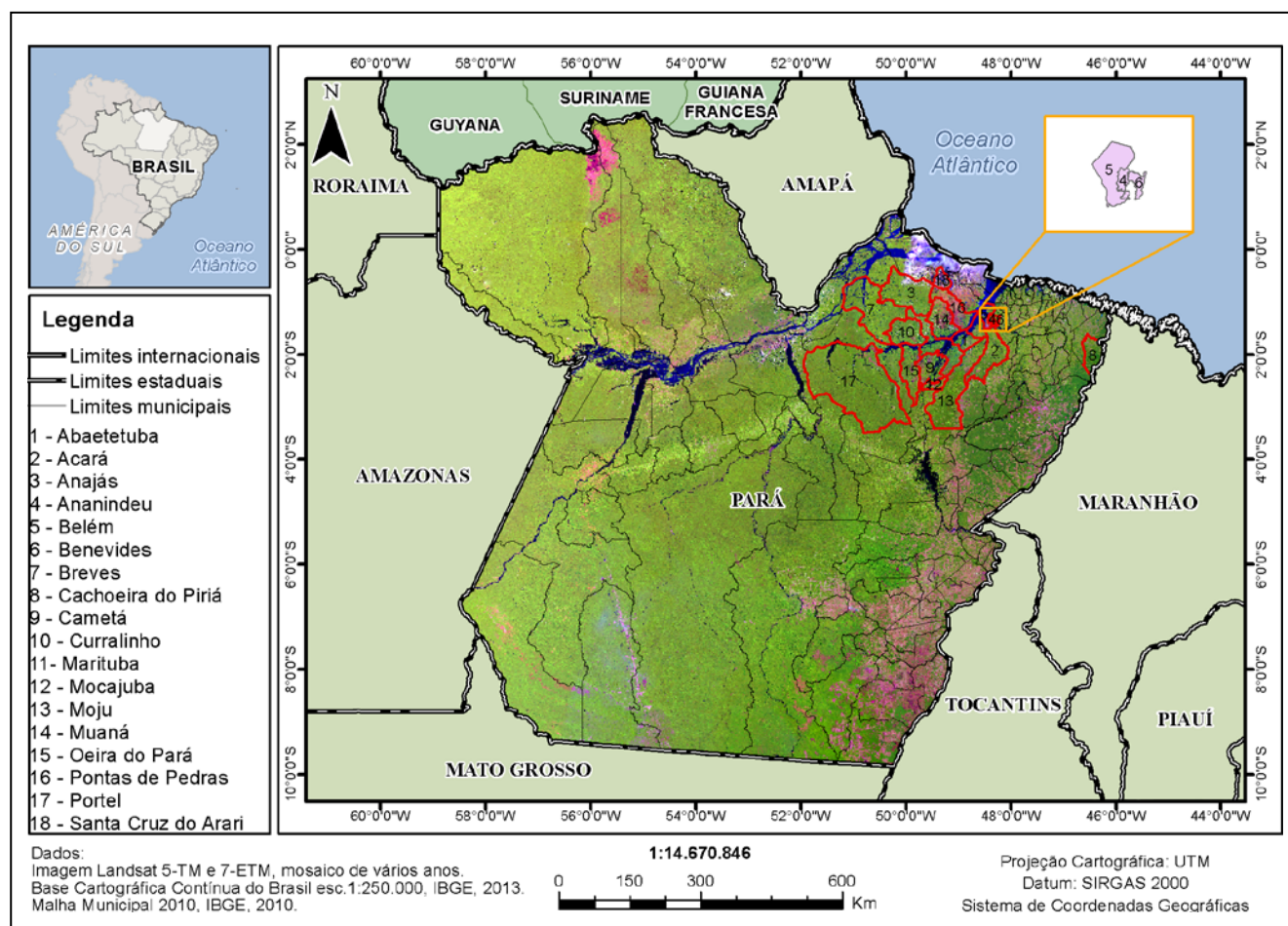
IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As amostras bacterianas estavam armazenadas em ágar estoque (Difco/USA) e foram repicadas para caldo Luria (LB-Difco/USA). Após a turvação do caldo, uma alíquota foi semeada em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS-Difco/USA). De cada placa foram selecionadas duas colônias lactose negativas e semeadas em ágar triplice-açúcar-ferro (TSI-Difco/USA) e ágar lisina ferro (LIA-Difco/USA), seguida de incubação à temperatura de 37° C por 24 h. As amostras que apresentaram reações características foram identificadas bioquimicamente segundo as recomendações de

Ewing²⁴. Após essa etapa foi realizada identificação sorológica determinando os antígenos somáticos (OD1), de envoltório (Vi) e flagelar (Hd) para a confirmação do sorotipo *S. Typhi*.

EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO E PCR

O DNA das amostras bacterianas foi extraído pela técnica de fervura e congelamento²⁵. Na PCR foram utilizados iniciadores para a região do gene *viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*, como descrito na tabela 1. Cada reação de amplificação teve um volume final 25 µL, contendo 20 ng de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5/µM MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 1,25 mM de cada *primer* e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador automático de gradiente modelo Vereti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems – US), com a utilização do programa: 4 min a 95° C, 35 ciclos com de 1 min a 95° C, 1 min a 60° C e 1 min a 72° C, terminando com uma etapa de alongamento final de 7 min a 72° C. Após a amplificação para visualização do produto final da PCR, todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose (2%). E os tamanhos dos fragmentos amplificados foram mensurados com a utilização de marcador de peso molecular 1 Kb.



Fonte: LabGeo IEC/SVS/MS.

Figura 1 – Estado do Pará, com destaque para os 18 municípios investigados neste estudo

Tabela 1 – Genes alvo, primers utilizados, números de pares de bases dos amplicons (pb) e referência

Gene Alvo	Sequência dos primers	Amplicon (pb)	Referência
<i>viaB</i> F	GTTATTTTCAGCATAAGGAG	439 pb	Levy et al ²⁶
<i>viaB</i> R	CTTCCATACCACTTTCCG		
<i>prt</i> F	CGTTTGGGTTCTTGGATCACG	369 pb	Kumar et al ¹²
<i>prt</i> R	CTATAATGGCGGCGGCGAGTTC		
<i>fliC-d</i> F	GCTTAATGTCCAAGATGCCTAC	587 pb	Kumar et al ¹²
<i>fliC-d</i> R	GAGCAACGCCAGTACCATCTG		
<i>invA</i> F	CGAGCAGCCGCTTAGTATTGAG	881 pb	Kumar et al ¹²
<i>invA</i> R	CCATCAAATTAGCGGAGGCTTC		

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DA TÉCNICA

A especificidade dos primers foi testada submetendo-se à PCR o DNA de diferentes microrganismos de referência da microbiota do trato gastrointestinal e de agentes patogênicos, tais como: *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella Paratyphi A* ATCC 7245, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella Panama* ATCC 2656, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *Shigella flexneri* ATCC 12022. Para determinação da sensibilidade da técnica, o DNA de *S. Typhi* foi submetido a diluições seriadas em água ultra pura (Invitrogen) e em seguida ao protocolo da PCR. Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotômetro (Nano-Drop ND 100 UV-Vis).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística dos resultados foi realizada por testes não-paramétricos (Qui-quadrado com correção de Yates), utilizando o programa Bioestat 5.0²⁷, com $\alpha = 0,05$ e nível de significância dos resultados no valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

FAIXA ETÁRIA/GÊNERO

A tabela 2 apresenta o total e o percentual dos sexos masculino e feminino envolvidos nos casos de febre tifoide, transcritos das fichas clínico-epidemiológicas, e a distribuição nas diferentes faixas etárias durante o período de 2009 a 2011. Do total de amostras analisadas, 64% (48/75) são pertencentes ao gênero masculino e 36% (27/75) ao feminino, com diferença significativa entre os sexos ($p = 0,0209$). A faixa etária variou de 1 a 60 anos, com maior frequência da doença entre 19 e 60 anos em ambos os sexos. Ainda no que tange a faixa de idade, os dados obtidos demonstram que 52 (69,3%) eram adultos e nove (12%) eram crianças ($p = < 0,0001$).

SAZONALIDADE DOS CASOS

Com relação à distribuição sazonal da doença, a tabela 3 mostra o semestre/ano, respectivamente, dos isolamentos das amostras analisadas. Observa-se que a maior ocorrência foi no segundo semestre, o que coincide com o período de pouca chuva na região

($p = 0,0209$). Na análise da distribuição anual dos casos de febre tifoide no período de 2009 a 2011 destaca-se a maior ocorrência em 2010, com 31 casos, seguido dos anos 2009²³ e 2011²¹; sendo que a maioria foi detectada na hemocultura (54-72%) em relação à coprocultura (21-28%) ($p = 0,0002$) (Tabela 4).

LOCAIS DE OCORRÊNCIA

Durante o período de 2009-2011, verificou-se a ocorrência de pacientes com febre tifoide em 18 municípios, com destaque para Belém, com 28 casos (37,3%), e, em sequência, as prevalências dos Municípios de Ananindeua, 14 (18,7%) e Abaetetuba, seis (8,0%). E por ordem decrescente de frequência, os demais Municípios: Santa Cruz do Arari, quatro (5,3%), Curralinho, três (4%); Mocajuba, Muaná, Ponta de Pedras e Portel com dois (2,7%); Acará, Anajás, Benevides, Breves, Cachoeira do Arari, Cametá, Marituba, Moju e Oeiras do Pará com um (1,3%). Não informados, três (4%).

Na figura 2 localiza-se a distribuição dos casos de febre tifoide nos bairros do Município de Belém, com a maior prevalência nos bairros de Jurunas e Marco, cinco (17,8%), seguido de Condor e Terra Firme, três (10,7%), e Tenoné, dois (7,1%).

DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA *viaB*, *prt*, *fliC-d* E *invA* POR MEIO DA PCR

A PCR convencional, com quatro pares de primers *viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA* identificaram corretamente *S. Typhi* produzindo quatro bandas positivas; que consistem dos seguintes produtos da PCR: *viaB* (439 pb), *prt* (369 pb), *fliC-d* (587 pb) e *invA* (881 pb) pesquisados em todas as 75 amostras selecionadas. Todos os quatro marcadores foram amplificados e observados em 100% das amostras analisadas (Figura 3).

ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DA TÉCNICA

A especificidade da técnica foi avaliada submetendo-se à PCR o DNA de diferentes microrganismos da microbiota normal do trato gastrointestinal e de enteropatógeno (Tabela 5). Todas as amostras de *Salmonella* foram positivas para o gene *invA*. Como esperado, os iniciadores *prt* neste estudo amplificaram tanto os sorotipos Typhi como os Paratyphi A, obtendo-se produtos de PCR com o mesmo tamanho (369 pb).

Por outro lado, os genes *viaB* e *fliC-d* apresentaram amplificação somente em *S. Typhi*. Estes resultados demonstram que os genes *viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*, quando amplificados em conjunto, foram específicos para as cepas de *S. Typhi*. Assinala-se que todas as amostras de

bactérias de referência, bem como os isolados clínicos de *Salmonella*, foram identificadas com precisão pelo teste. O limite de detecção da PCR, ou seja, a quantidade mínima de DNA necessária para se obter uma reação positiva, foi de 0,5 pg/25 µL de reação.

Tabela 2 – Distribuição dos casos de febre tifoide de acordo com a faixa etária e o sexo no período de 2009 a 2011, Estado do Pará, Brasil

Grupos	Faixa etária	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino			
		N	%	N	%	N	%
Crianças	1 – 12	6	8	3	4	9	12
Adolescentes	13 – 18	10	13,3	2	2,7	12	16
Adultos	19 – 60	32	42,7	20	26,7	52	69,3
Não informado		–	–	2	2,7	2	2,7
Total		48	64	27	36	75	100

Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Tabela 3 – Distribuição dos casos de febre tifoide por semestre e ano no período de 2009 a 2011, Estado do Pará, Brasil

Semestre	Ano						Total	
	2009		2010		2011			
	N	%	N	%	N	%	N	%
1° semestre	9	12	10	13,3	8	10,7	27	36
2° semestre	14	18,7	21	28	13	17,3	48	64
Total	23	30,7	31	41,3	21	28	75	100

Tabela 4 – Distribuição e percentual dos isolamentos de *S. Typhi* em coproculturas e hemoculturas no período de 2009 a 2011, Estado do Pará, Brasil

Exames	Ano						Total	
	2009		2010		2011			
	N	%	N	%	N	%	N	%
Hemocultura	16	21,3	24	32	14	18,7	54	72
Coprocultura	7	9,3	7	9,3	7	9,3	21	28
Total	23	30,7	31	41,3	21	28	75	100

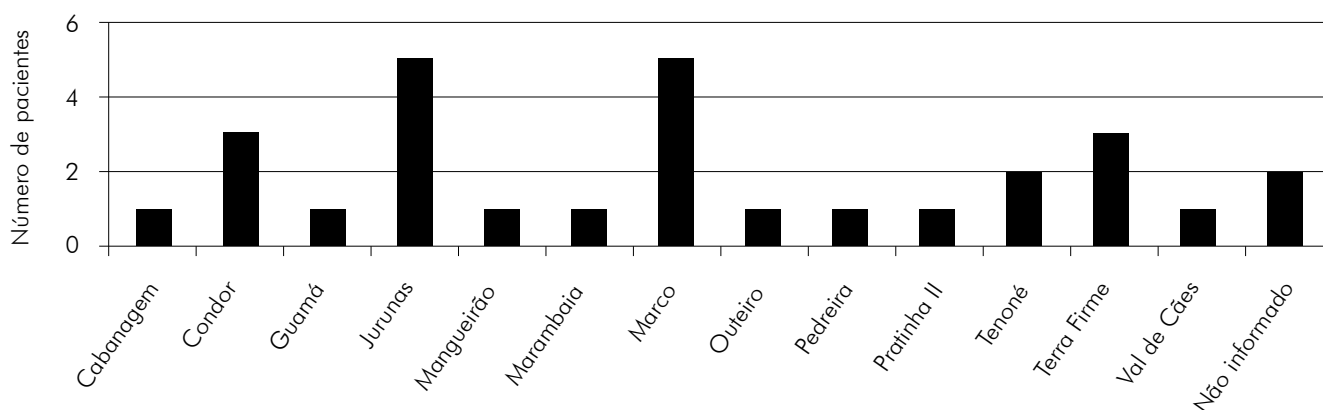
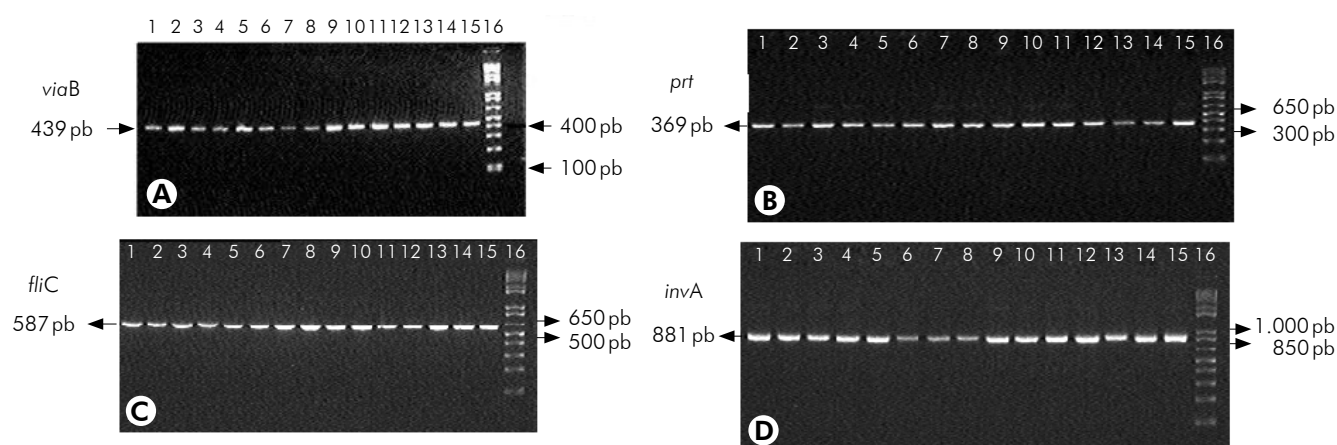


Figura 2 – Distribuição dos casos de febre tifoide de acordo com os bairros do Município de Belém, Estado do Pará, Brasil, no período de 2009 a 2011



A: *viaB*; **B:** *prt*; **C:** *fliC-d*; **D:** *invA*; Linha 16 Ladder de 1 Kb; Linhas 1 a 15 de *S. Typhi*.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação para os genes *viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*, respectivamente

Tabela 5 – Cepas bacterianas utilizadas para a avaliação da especificidade dos iniciadores de PCR

Cepas bacterianas	<i>viaB</i>	<i>prt</i>	<i>fliC-d</i>	<i>invA</i>
<i>Salmonella Enteritidis</i>				
<i>Typhi</i>	+	+	+	+
<i>Typhimurium</i> ATCC 14028	–	–	–	+
Panama ATCC 2656	–	–	–	+
Paratyphi A ATCC 7245	–	+	–	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	–	–	–	–
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–

DISCUSSÃO

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES

Em relação à faixa etária/gênero, os dados sobre a maior incidência de doença se situaram na faixa etária de 19 a 60 anos, tanto para o sexo masculino como para o feminino, próximo daquela que é observada no Brasil, que é entre 15 a 45 anos²⁸. Nas últimas décadas, foi constatado no Brasil um declínio referente aos coeficientes de morbimortalidade ocasionada por febre tifoide. Na década de 2000, foram notificados, em média, 800 casos. A partir de 2007, essa média tem sido de 399 casos, com maior concentração nas Regiões Norte e Nordeste^{2,4}. Tais dados devem ser avaliados cuidadosamente no que se refere à representatividade e à fidedignidade, uma vez que pouco menos da metade dos óbitos registrados possuem causa básica ignorada; existem dificuldades

na identificação do agente etiológico, nos diagnósticos laboratoriais; existem diferenças nos dados sobre febre tifoide, quando se compara o sistema de informação com fontes distintas. Outro aspecto se concentra nas análises por unidades da federação e regiões, quando se verifica variações importantes nesses indicadores.

O Norte e o Nordeste concentram maior número de casos, devido às deficiências das condições sanitárias, uma vez que poucos indivíduos do total da população dispõem de esgotos e acesso à rede de água²⁹, estando sua distribuição relacionada com o desenvolvimento socioeconômico de cada região. Com base nos dados, observa-se que a febre tifoide no Estado do Pará apresenta sazonalidade de maior ocorrência no segundo semestre, o que coincide com o período de pouca chuva na região. Como a carga infectante é de 10^6 a 10^9 unidades de bactérias ingeridas, torna-se incomum a ocorrência de surtos

durante o período chuvoso, possivelmente devido à diluição do agente infectante no meio, dificultando que reúna a concentração de organismos em quantidade comparável à dose infectante²⁸.

Durante o período de estudo, verificou-se maior frequência de febre tifoide no Município de Belém, nos bairros do Jurunas e Marco. Admite-se que essa elevada frequência no bairro do Jurunas deve-se à existência de portos que facilitem a entrada de pessoas oriundas de áreas com maior endemicidade. Este bairro também detém, no Município de Belém, os maiores consumos e comercialização de frutos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), cuja safra ocorre no segundo semestre do ano, coincidindo com o período de sazonalidade da doença³⁰.

O IEC mantém um programa de vigilância das doenças entéricas, destacando-se ações voltadas ao diagnóstico de febre tifoide como laboratório de referência regional para o agravo. Do final dos anos 1980 até o início dos anos 1990, essa atividade ganhou impulso, sobretudo com a observação do aumento da incidência da doença em alguns municípios, como descrito acima. Apesar destas relevantes observações, a doença ainda é subnotificada, principalmente pela dificuldade encontrada no reconhecimento clínico, dada a extensa lista de outras causas de febre, que constitui diagnóstico diferencial, com ela, contribuindo para que muitos casos não sejam identificados e notificados.

FATORES DE VIRULÊNCIA

A PCR fornece um meio rápido e específico para monitorar este microrganismos numa variedade de amostras. Vários métodos de amplificação como monoplex PCR, Nested PCR e PCR em tempo real têm sido usados para a detecção de *Salmonella*^{10,26,31}.

A diferenciação de *Salmonella* sp dos demais microrganismos pela utilização da PCR do gene *invA* foi constatada por Rahn et al³², que observaram que a sequência do gene fora amplificada e era única em 630 amostras de *Salmonella* estudadas, pertencentes a 100 sorotipos diferentes. Em nosso trabalho, foi evidenciado que todas as amostras de *S. Typhi* analisadas foram positivas para o gene *invA*, estando de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Rahn et al³² e corroboram os experimentos desenvolvidos por Whang et al³³, quando afirmaram que o gene *invA* se apresenta conservado em todos os sorotipos de *Salmonella*, sendo o gene eleito para detecção desta bactéria pela PCR.

O antígeno Vi pode ser encontrado também em *S. Paratyphi C*, *Salmonella* Dublin e *Citrobacter freundii*. Estudos com *S. Typhi* identificaram a presença de pelo menos dois loci para o gene codificante do antígeno Vi, denominados *viaA* e *viaB*, ambos responsáveis por

expressar o antígeno capsular Vi. Destes, o gene *viaB* apresenta-se específico para cepas que expressam o antígeno Vi, enquanto o *viaA* é observado nas bactérias entéricas¹⁸. No presente trabalho, o gene *viaB* foi amplificado nas 75 amostras de *S. Typhi* investigadas. Análises realizadas pela utilização da PCR com o DNA de outras bactérias (*E. coli* ATCC 25922, *S. Paratyphi A* ATCC 7245, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Panama* ATCC 2656, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *Shigella flexneri* ATCC 12022) não evidenciaram a amplificação deste gene.

O lipopolissacárido - antígeno O, juntamente com os antígenos flagelares H1 e H2, servem de base para sorotipagem de *Salmonella*³⁴. A síntese do LPS é codificada por cerca de 20 genes, entre eles o gene *prt*. Das 75 amostras de *S. Typhi* analisadas, 100% apresentaram amplificação positiva para o gene *prt*, sinalizando o potencial patogênico das amostras investigadas e a sensibilidade da técnica da PCR na identificação de genes envolvidos na virulência.

Alguns dos antígenos flagelares são compostos de um único fator antigênico (dito monofásico), como para a detecção do gene *fliC-d* (gene para o antígeno da flagelina d[H: d]) de *S. Typhi*, apresentando-se como excelente marcador para identificação da *S. Typhi*. No presente trabalho, todas as amostras de *S. Typhi* analisadas foram positivas para a presença do gene *fliC-d*. Estes resultados eram esperados com frequência de 100%, visto que este gene é considerado alvo para determinação do sorotipo *S. Typhi*.

CONCLUSÃO

A maioria dos casos ocorreu entre os adultos, sem diferença significativa em relação ao sexo, no período não chuvoso, durante o segundo semestre de cada ano, com aumento de casos no ano de 2010 em relação aos demais anos. A maior prevalência foi na capital, Belém, nos bairros do Jurunas e Marco, seguida dos Municípios de Ananindeua e Abaetetuba. Na análise genética, as cepas *S. Typhi* foram altamente similares para os genes de virulência analisados *viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*; os genes permaneceram estáveis ao longo das análises desde o isolamento. Desta forma, os primers apresentaram-se específicos para todas as cepas testadas de *S. Typhi* e, deste modo, passíveis de serem utilizados na detecção deste microrganismo pela PCR. Ensaios estão sendo realizados para avaliação destes primers frente a amostras clínicas (sangue e fezes) buscando-se o estabelecimento de uma metodologia para o diagnóstico da febre tifoide por meio da PCR.

AGRADECIMENTOS

Aos profissionais da Seção de Bacteriologia e Micologia do IEC pelo apoio técnico e administrativo.



Epidemiological profile and molecular characterization of *Salmonella* Typhi strains isolated in Pará State, Brazil

ABSTRACT

Salmonella enterica serotype Typhi, the etiological agent of typhoid fever, a systemic disease that causes prolonged fevers with intestinal disorders and may progress to bowel perforation. In Pará State, Brazil, the endemicity reflects a great number of outbreaks and sporadic cases in different municipalities. The aim of this present study was to carry out an epidemiologic and molecular characterization of *Salmonella* Typhi strains isolated in Pará State. Four virulence genes (*viaB*, *prt*, *fliC-d* and *invA*) were analyzed in 75 cases with typhoid fever isolation from blood cultures and stool cultures in the period 2009 to 2011. In order to investigate the cross-reactivity, six other species of enterobacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Panama, *Proteus mirabilis*, and *Shigella flexneri*) were included. Samples were analyzed and 64% of them are from male subjects and 36% from female ones, with a significant difference between sexes ($p = 0.0209$). The analysis of annual distribution of typhoid cases highlights the biggest event in 2010, with 31 cases. Most of the cases was detected in blood culture (72%) compared to fecal culture (28%) ($p = 0.0002$). Conventional PCR with four pairs of primers identified *S. Typhi* correctly, producing four positive bands observed in 100% of samples. In the genetic analysis, the *S. Typhi* strains were highly similar to the genes analyzed which remained stable throughout the analysis since their isolation. Thus, the four pairs were specific primers capable of being used in the identification and characterization of *S. Typhi*.

Keywords: *Salmonella* Typhi; Polymerase Chain Reaction; Virulence Factors; Diagnosis.

Perfil epidemiológico y caracterización molecular de *Salmonella* Typhi aisladas en el Estado de Pará, Brasil

RESUMEN

La *Salmonella enterica* serotipo Typhi es el agente etiológico de la fiebre tifoidea, enfermedad sistémica que ocasiona cuadros de fiebres prolongadas juntamente con disturbios intestinales, que pueden evolucionar hasta la perforación intestinal. En el Estado de Pará, Brasil, la endemicidad refleja un vasto número de brotes y de casos esporádicos en diferentes municipios. El presente estudio tuvo como objetivo realizar una caracterización epidemiológica y molecular de *Salmonella* Typhi aisladas en el Estado de Pará. Se analizaron cuatro genes de virulencia (*viaB*, *prt*, *fliC-d* e *invA*) en 75 casos de fiebre tifoidea con aislamiento a partir de hemocultivos y coprocultivos, en el período de 2009 a 2011. Para averiguar una reacción cruzada, se incluyeron seis especies de otras enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Panama, *Proteus mirabilis* y *Shigella flexneri*). Del total de muestras analizadas, 64% son oriundas de individuos del género masculino y 36%, del femenino, con diferencia significativa entre los sexos ($p = 0,0209$). En el análisis de la distribución anual de los casos de fiebre tifoidea se destaca la mayor ocurrencia en el 2010, con 31 casos. La mayoría se detectó en el hemocultivo (72%) en relación al coprocultivo (28%) ($p = 0,0002$). La PCR convencional, con cuatro pares de primers identificó correctamente *S. Typhi*, produciendo cuatro bandas positivas, observadas en 100% de las muestras analizadas. En el análisis genético, las cepas *S. Typhi* fueron altamente similares para los genes analizados, que permanecieron estables durante los análisis, desde el aislado. De esta forma, los cuatros pares de primers se presentaron específicos y, de este modo, pasibles de ser utilizados en la identificación y caracterización de *S. Typhi*.

Palabras clave: *Salmonella* Typhi; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Factores de Virulencia; Diagnóstico.



REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. Geneva: World Health Organization; 2003.
- 2 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância e controle da febre tifóide. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
- 3 Lynch MF, Blanton EM, Bulens S, Polyak C, Vojdani J, Stevenson J, et al. Typhoid fever in the United States, 1999-2006. JAMA. 2009 Aug;302(8):859-65.
- 4 Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Tabela de casos confirmados de febre tifóide Brasil, grandes regiões e Unidades Federadas 1998-2008 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008 [citado 2010 jul 22]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_febre_tifoide.pdf.
- 5 Santos EO, Travassos da Rosa JF, Jesus IM, Loureiro ECB. A saúde das populações da Amazônia Brasileira. In: Yarzabal L, Espinal C, Aragon LE, editores. Enfoque integral de la salud humana en La Amazonia. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 1992. p. 95-156. (Cooperación Amazónica; vol. 10).

- 6 Ramos FLP, Oliveira JRS, Silva JCL. Epidemia de febre tifóide na localidade Cipoal, município de Óbidos, Estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31 supl 1:S77.
- 7 Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Instituto Evandro Chagas. Relatório de investigação epidemiológica de surto de febre tifóide no município de Moju, Pará. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1999.
- 8 Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Instituto Evandro Chagas. Relatório de investigação epidemiológica de surto de febre tifóide no município de Moju, Pará. Belém: Instituto Evandro Chagas; 2001.
- 9 Ramos FLP. Febre tifóide: a experiência do Instituto Evandro Chagas [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Mestrado em Doenças Tropicais; 2005.
- 10 Loureiro ECB, Sá LLC, Ramos FLP, Vicente ACP. Diagnóstico de *Salmonella Typhi* em amostras ambientais por PCR, durante surto de febre tifóide ocorrido em Moju-Pa. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33 supl 1:S188-9.
- 11 Loureiro ECB, Marques NDB, Ramos FLP, Reis EMF, Rodrigues DP, Hofer E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010 mar;1(1):93-100.
- 12 Kumar S, Balakrishna K, Batra HV. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. *Lett Appl Microbiol*. 2006 Feb;42(2):149-54.
- 13 Das A, Sree Hari S, Shalini U, Ganeshkumar A, Karthikeyan M. Molecular characterisation of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolated from typhoidial humans. *Malays J Microbiol*. 2012 Sep;8(3):148-55.
- 14 Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganism. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 116-37.
- 15 Farber JM. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Protection*. 1996 Oct;59(10):1023-137.
- 16 Vieira MAM. Ilhas de patogenicidade. *Mundo Saude*. 2009;33(4):406-14.
- 17 Figueiroa Ochoa IMF, Verugo Rodriguez AV. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol [Internet]*. 2005 ene-jun [citado 2013 jul 13];47(1-2):25-42. Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf.
- 18 van Asten AJAM, van Dick JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Jun;44(3):251-9.
- 19 Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. *J Bacteriol*. 1992 Jul;174(13):4338-49.
- 20 Porter SB, Curtiss R. Effect of *inv* mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. *Avian Dis [Internet]*. 1997 Jan-Mar [cited 2013 Aug 20];41(1):45-57. Available from: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1592442?uid=37506&uid=3737664&uid=2129>.
- 21 Campos LC. *Salmonella*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 319-28.
- 22 McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, Fields PI. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):1923-32.
- 23 Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990 e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, aprovar as seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União*, Brasília, p. 59, 13 jun 2013. Seção 1.
- 24 Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol*. 1986 Oct;36(4):581-2.
- 25 Baloda SB, Krovacek K, Eriksson L, Linné T, Månsson I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1995 Jan;18(1):17-26.
- 26 Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, et al. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J Clin Microbiol*. 2008 May;46(5):1861-6.
- 27 Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DM, Santos AS. *BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2005. 324 p.
- 28 Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: aids / hepatites virais. Vol. 1. 5. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2002. Febre tifoide; p. 331-45.

- 29 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância e controle da febre tifoide. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
- 30 Ramos FLP, Lins-Lainson ZC. Febre tifóide: enfoque clínico, epidemiológico e laboratorial de 86 casos diagnosticados no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, de janeiro de 1993 a março de 1997. Rev Para Med. 1997;11(2):8-13.
- 31 Farrell JJ, Doyle LJ, Addison RM, Reller LB, Hall GS, Procop GW. Broad-range (Pan) *Salmonella* and *Salmonella* serotype typhi-specific real-time PCR assays: potential tools for the clinical microbiologist. Am J Clin Pathol. 2005 Mar;123(3):339-45.
- 32 Ranh K, Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes. 1992 Aug;6(4):271-9.
- 33 Whang YP, Lia L, Shena JZ, Yangb FJ, Wu YW. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA* growth and intracellular invasion and survival. Vet Microbiol. 2009 Feb;133(4):328-34.
- 34 Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris: Pasteur Institute; 2001.

Recebido em / Received / Recibido en: 20/3/2014
Aceito em / Accepted / Aceito en: 12/11/2014