

Variabilidade genética de amostras de *Salmonella Typhi* isoladas de surto e de casos esporádicos ocorridos em Belém, Brasil

Primeira submissão em 28/11/07
Última submissão em 26/09/08
Aceito para publicação em 02/11/08
Publicado em 20/08/08

Genetic variability of *Salmonella Typhi* samples isolated from outbreaks and sporadic cases of typhoid fever in Belém, Brazil

Flávia Corrêa Bastos¹; Karla Valéria Batista Lima²; Lena Lílian Canto de Sá³; Cintya de Oliveira Souza⁴; Maria Luíza Lopes⁵; Francisco Lúzio de Paula Ramos⁶

unitermos	resumo
<i>Salmonella Typhi</i>	<p>Introdução: <i>Salmonella Typhi</i> é o agente da febre tifóide (doença caracterizada por febre, cefaléia, mialgia, artralgia, diarreia ou constipação), cujo quadro pode se complicar e levar o paciente a óbito. No Brasil, a febre tifóide é endêmica nas regiões Norte e Nordeste, com surtos ocorridos nos meses de intenso calor. Objetivo: Analisar e comparar a variabilidade genética de <i>S. Typhi</i> isoladas de surto e casos esporádicos de febre tifóide ocorridos em determinado período na cidade de Belém (PA). Material e métodos: Foram analisadas 20 amostras de <i>S. Typhi</i>: 10 isoladas de um surto ocorrido no bairro do Guamá, Belém, entre os meses de dezembro/2005 e março/2006, e 10 de casos esporádicos ocorridos em diferentes localidades da mesma cidade e no mesmo período do surto. A caracterização genética foi realizada pela análise do perfil de macrorestrição obtido pela enzima XbaI e definido por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Resultados: A análise de XbaI-PFGE das amostras estudadas demonstrou uma similaridade genética de 83% a 100%. Conclusão: Este estudo pôde demonstrar a relação clonal das amostras <i>S. Typhi</i> causadoras de surto e de casos esporádicos de febre tifóide ocorridos na cidade de Belém no período de dezembro/2005 a março/2006.</p>
Febre tifóide	
PFGE	
Surto	
Casos esporádicos	

abstract

Background: *Salmonella Typhi* is the causative agent of typhoid fever, illness characterized by fever, migraine, myalgia, arthralgia, diarrhea or constipation, which may have complications and cause death. In Brazil, the typhoid fever is endemic in the Northern and Northeastern regions, with outbreaks occurring in scorching months. **Objective:** To analyse and compare the genetic variability of *S. Typhi* strains isolated from outbreaks and sporadic cases of typhoid fever occurred in the city of Belém (PA) between December 2005 and March 2006. **Material and methods:** Twenty samples of *S. Typhi* were analyzed: 10 of them were isolated from an outbreak occurred in Guamá neighborhood in Belém, between December 2005 and March 2006, and the other 10 were isolated from sporadic cases in different neighborhoods of the same city in the same outbreak period. The genetic characterization was performed by macrorestriction analysis of genomic DNA with XbaI enzyme defined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results:** The XbaI-PFGE analysis of the studied samples revealed a genetic similarity of 83% to 100%. **Conclusion:** This study demonstrated the clonal relation between the *S. Typhi* samples from the outbreak and from the sporadic cases of typhoid fever occurred in the city of Belém between December 2005 and March 2006.

key words

Salmonella Typhi
Typhoid fever
PFGE
Outbreak
Sporadic cases

1. Estudante de doutoramento no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA).
2. Pesquisadora responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas (IEC).
3. Pesquisadora responsável pelo Laboratório de Microbiologia da seção de Meio Ambiente do IEC.
4. Farmacêutica; mestre; Seção de Bacteriologia do IEC.
5. Chefe da Seção de Bacteriologia do IEC.
6. Médico pesquisador da Seção de Bacteriologia do IEC.
Trabalho realizado no Laboratório de Enterobactérias, na Seção de Bacteriologia do IEC.

Introdução

Salmonella enterica sorovar *Typhi* é o agente etiológico da febre tifóide. É responsável por 22 milhões de novos casos por ano no mundo, 5% dos quais são fatais^(4, 7). Hoje a maioria dos surtos dessa doença ocorre em países em desenvolvimento⁽¹⁵⁾.

A transmissão da enfermidade se dá pela ingestão de água ou de alimentos contaminados com fezes humanas ou, menos freqüentemente, com urina contendo a bactéria; mais raramente pode ser transmitida pelo contato direto (mão/boca) com fezes, urina, secreção respiratória, vômito ou pus proveniente de indivíduo infectado. A doença se caracteriza clinicamente por febre, cefaléia, diarreia e/ou constipação, dor abdominal, podendo causar ainda danos respiratórios, hepáticos, esplênicos e neurológicos. A emergência da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis pode ainda ser um fator agravante dessa salmonelose, já que o tratamento de indivíduos com febre tifóide consiste basicamente em antibióticos e reidratação.

O ácido gástrico constitui a primeira barreira natural contra *Salmonella*. Aquela que consegue transpor essa barreira chega ao intestino delgado e, após invadir a parede do órgão, alcança a circulação sanguínea. Daí a bactéria pode atingir qualquer órgão. Porém atinge preferencialmente órgãos do sistema fagocítico monocitário, como fígado, baço, medula óssea e vesícula biliar.

A forma mais efetiva de impedir a instalação e a disseminação da doença em uma localidade é implantando saneamento básico e fornecendo água potável para toda a população, além de campanhas educativas salientando a importância da higiene domiciliar e pessoal. Cabe ainda ressaltar que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado ajudam a diminuir o aparecimento de novos casos.

A fagotipagem, até pouco tempo atrás, era o método mais comumente utilizado para a caracterização de *S. Typhi*, porém essa técnica apresenta limitações, em virtude de se basear somente no fenótipo. Daí a tendência atual de se primar por técnicas moleculares, por serem mais discriminatórias e, portanto, mais apropriadas para aplicação em estudos epidemiológicos⁽¹²⁾.

Diversos métodos na esfera molecular têm sido aplicados na tipagem dessa espécie bacteriana: análise de polimorfismos para sítios de restrição, ribotipagem, análise de seqüências nucleotídicas e eletroforese de campo pulsado (PFGE). A última tem sido utilizada com sucesso no estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossomal de diver-

sos patógenos em investigações epidemiológicas. O perfil eletroforético gerado por PFGE permite clara diferenciação polimórfica das amostras com poucas dificuldades de interpretação e ambigüidades quando comparado com outras técnicas moleculares⁽¹⁹⁾. Por isso é considerado padrão-ouro para genotipagem entre as salmonelas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de amostras de *S. Typhi* isoladas de surto e de casos esporádicos de febre tifóide, ocorridos na cidade de Belém (Pará) e comparar os perfis eletroforéticos gerados por PFGE entre elas.

Material e métodos

Amostras bacterianas

Vinte amostras de *S. Typhi* isoladas no período de dezembro de 2005 a março de 2006 na Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) foram analisadas. Dez delas foram isoladas de um surto ocorrido no bairro do Guamá, na periferia da cidade de Belém (**Tabela 1**); as demais foram isoladas de casos não relacionados com o surto, ocorridos em diferentes localidades da mesma cidade, detectados em pacientes que procuraram atendimento médico no ambulatório da Seção de Bacteriologia do IEC (**Tabela 2**). Todas as amostras foram isoladas a partir de sangue e/ou fezes, pelos métodos de hemocultura ou coprocultura, respectivamente. As amostras foram identificadas por testes bioquímicos-padrão e confirmados por teste de aglutinação em lâmina, utilizando-se anti-soros, somáticos, flagelar e de envoltório específicos para *Salmonella Typhi*.

Eletroforese em gel de campo pulsado

Foi realizada para avaliar a relação clonal entre as amostras de *S. Typhi* estudadas, utilizando-se a técnica de acordo com Gautom (1997)⁽⁶⁾, mas com algumas modificações. A digestão do DNA extraído em miniblocos de agarose foi feita pela enzima de restrição XbaI a 37°C por 16 a 18 horas. A corrida eletroforética foi realizada em sistema de eletroforese do tipo CHEF-DR III (Bio-Rad). A eletroforese ocorreu por um período de 24 horas a 160 V, com pulso inicial de 5 s e final de 50 s em tampão de corrida TBE (trisborato + ácido etilenodiaminotetracético [EDTA]) 0,5x.

Os perfis eletroforéticos gerados por PFGE foram analisados utilizando-se o software BioNumerics (*Applied Maths, Belgium*), e a similaridade entre esses perfis foi avaliada com base no coeficiente de similaridade Dice (3% de tolerância).

Tabela 1 Amostras analisadas de *S. Typhi* isoladas durante surto de febre tifóide

Registro	Data de isolamento	Exame	Idade	Sexo
2628	05/12/06	Coprocultura e hemocultura	19	M
082	9/1/06	Coprocultura e hemocultura	34	M
400	9/2/06	Coprocultura	37	F
401	9/2/06	Coprocultura	34	M
460	13/2/06	Coprocultura	25	F
695	3/3/06	Hemocultura	53	F
889	15/3/06	Coprocultura e hemocultura	31	M
717	27/3/06	Hemocultura	-	F
723	27/3/06	Hemocultura	-	F
1006	29/3/06	Coprocultura e hemocultura	41	F

Tabela 2 Amostras analisadas de *S. Typhi* isoladas de casos esporádicos de febre tifóide

Registro	Data de Isolamento	Exame	Idade	Sexo
2721	15/12/05	Coprocultura	6	F
0019	3/1/06	Coprocultura	66	M
157	3/1/06	Coprocultura	26	M
226	23/1/06	Hemocultura	23	F
299	27/1/06	Coprocultura	12	M
350	1/2/06	Coprocultura	18	M
685	22/2/06	Coprocultura	21	M
798	2/3/06	Hemocultura	23	M
694	3/3/06	Coprocultura	48	M
1270	29/3/06	Hemocultura	35	M

As amostras foram consideradas geneticamente idênticas quando houve completa concordância (100%) entre os perfis⁽¹⁶⁾.

Resultados

Eletroforese em gel de campo pulsado

A análise do polimorfismo de macrorrestrição obtido pela enzima XbaI revelou baixa diversidade nos perfis

gerados por PFGE para todas as amostras de *S. Typhi* analisadas, compartilhando similaridade em torno de 83% a 100% (**Figura 1**). Entre as amostras provenientes do surto, observou-se a formação de dois grupamentos distintos principais: S1 (695, 717, 723, 1006, 889) e S2 (082, 400) (**Figura 2**), apresentando 100% de similaridade entre as amostras de cada grupo. Dois grupamentos distintos e principais também foram observados entre as amostras dos casos esporádicos de febre tifóide: N1 (157, 266, 299) e N2 (685, 694, 798) (**Figura 3**). Essa análise pôde ainda revelar similaridade de 100% entre os grupos S1 e N1 (Figura 1).

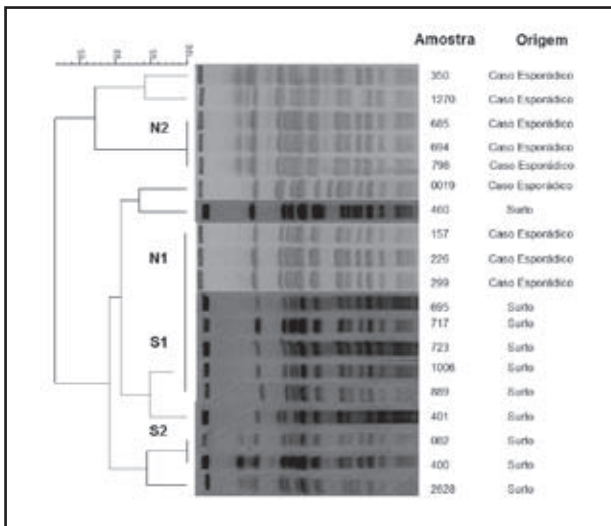


Figura 1 – Dendrograma da relação clonal das amostras *S. Typhi* isoladas de surto e casos esporádicos de febre tifóide determinada pela análise de macrorrestrição do DNA genômico com *XbaI*

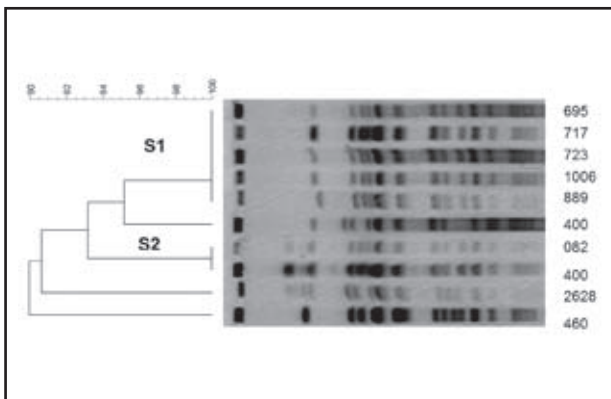


Figura 2 – Dendrograma da relação clonal das amostras *S. Typhi* isoladas de surto de febre tifóide determinada pela análise de macrorrestrição do DNA genômico com *XbaI*

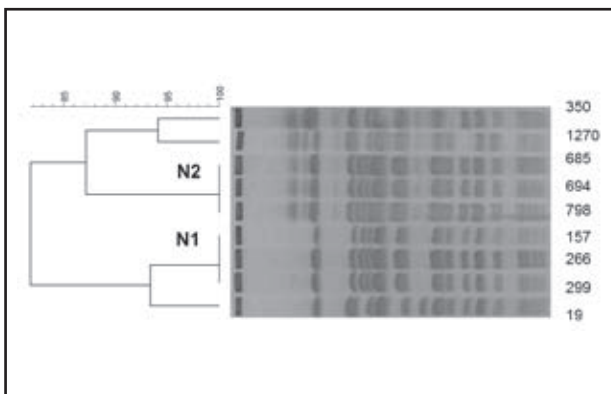


Figura 3 – Dendrograma da relação clonal das amostras *S. Typhi* isoladas de casos esporádicos de febre tifóide determinada pela análise de macrorrestrição do DNA genômico com *XbaI*

Discussão

No estado do Pará alguns surtos foram registrados nos últimos anos: Óbidos (1997), Mojú (1999) e Anajás (2001), todos detectados e acompanhados por técnicos do IEC, de Belém.

A ocorrência de *Salmonella Typhi* está associada a precárias condições de saneamento básico, higiene pessoal e ambiental, estando sua distribuição estreitamente relacionada com o desenvolvimento socioeconômico de cada área, refletindo as desigualdades sociais. Uma nítida e peculiar distribuição sazonal é verificada no estado do Pará, já que mais de 70% dos casos da doença são registrados durante o período de intenso calor, entre os meses de julho e dezembro^(13, 14).

Os perfis de macrorrestrição obtidos pela análise das amostras *S. Typhi* evidenciam relação de similaridade genética significativa entre elas. O polimorfismo das amostras relacionadas com o surto evidencia a presença de cinco genótipos idênticos de *S. enterica Typhi*, dois deles com maior distribuição (S1 e S2) (Figura 2).

A genotipagem de amostras aparentemente não-relacionadas evidenciou a ocorrência de dois surtos: um deles ocorrido em janeiro de 2006 (157, 226, 299) e outro no final de fevereiro de 2006 (685, 694 e 798). No primeiro surto (perfil N1) (Figura 1) a amostra foi capaz de permanecer na população local, reaparecendo em março de 2006 com novo surto (S1) (Figura 1). Isso está provavelmente relacionado com o fato de o homem participar, como portador, da cadeia de transmissão dessa salmonelose, sendo possível identificá-lo mediante o isolamento de *S. Typhi* com perfil idêntico ao das amostras endêmicas. Os clones endêmicos podem ainda permanecer na comunidade contaminando água e alimentos.

Ao se avaliarem as amostras provenientes do surto ocorrido no bairro do Guamá (Figura 2), observaram-se 90% de similaridade compartilhada. A pequena diversidade observada entre as amostras agrupadas e não-agrupadas pode ser decorrente da presença de um ancestral comum que persiste na comunidade através de portadores. A diversidade pode, então, ser justificada pelo acúmulo de alterações genéticas ocorridas.

Uma grande diversidade genética de amostras *S. enterica Typhi*, isoladas de casos esporádicos e surtos de febre tifóide ou de ambientes, tem sido descrita quando tais amostras são submetidas à tipagem por PFGE^(1, 3, 10, 17, 18). A eletroforese de campo pulsado pode ser desenvolvida após

tratamento do DNA genômico com diferentes enzimas de restrição como XbaI, SpeI e AvrII. No entanto, maior poder discriminatório tem sido relatado após utilização de XbaI, enzima selecionada para o desenvolvimento dos ensaios apresentados neste artigo^(9, 5, 11, 21).

A determinação de genótipos em surtos ou casos esporádicos é importante do ponto de vista epidemiológico, pois permite investigar a fonte de infecção, estabelecer a relação entre os casos clínicos e, com esse resultado, propor medidas que evitem a dispersão dos patógenos, além de controlar novos surtos.

Vale ressaltar que ao se analisarem os perfis gerados por PFGE de todas as amostras (Figura 1), uma similaridade em torno de 83% e de 100% (S1 e N1) foi verificada.

Vários estudos utilizaram a técnica de PFGE para avaliar epidemiologicamente amostras de *S. Typhi*, tanto de surtos como de casos esporádicos, confirmando a co-existência de múltiplos clones endêmicos^(3, 10, 18).

Thong *et al.*⁽¹⁷⁾ analisaram isolados de *S. Typhi* provenientes de surto e casos esporádicos ocorridos na Malásia entre os anos de 1987 e 1991. Chandel e Chaudhry⁽²⁾ encontraram um único

clone entre amostras de *S. Typhi* isoladas na Índia durante cinco anos. Outros autores, como Kariuki *et al.*⁽⁸⁾, também relataram a presença de um surto de febre tifóide no Quênia; já Thong *et al.*⁽²⁰⁾ observaram aumento da diversidade genética de isolados de *S. Typhi* na Nova Guiné de 1992 a 1999.

Deve-se ressaltar a importância dos resultados obtidos pela análise dos perfis gerados por PFGE, através dos quais foi possível sugerir a presença de um genótipo associado às amostras isoladas do surto e de casos esporádicos de febre tifóide na cidade de Belém, revelando que diferentes pessoas em diferentes localidades da cidade podem estar sendo contaminadas pelos mesmos genótipos de *S. Typhi*.

Conclusão

Em conclusão, os perfis gerados por PFGE pelas amostras isoladas dos casos esporádicos de febre tifóide bem como aquelas constituintes do surto demonstraram uma pequena diversidade genética, sugerindo o estabelecimento de um único genótipo de *S. Typhi* na cidade de Belém no período de dezembro de 2005 a março de 2006.

Referências

1. CARREIRA, A. G. A. *Caracterização molecular de Salmonella Typhi isoladas de surtos e casos esporádicos de febre tifóide ocorridos no estado do Pará. Belém, 2004.* Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
2. CHANDEL, D. S.; CHAUDHRY, R. Molecular typing reveals a unique clone of *Salmonella enterica* serotype Typhi among Indian strains. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 2673-5, 2006.
3. CONNERTON, P. *et al.* Epidemic typhoid in Vietnam: molecular typing of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi from four outbreaks. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 895-7, 2000.
4. CRUMP, J. A.; LUBY, S. A. P.; MINTZ, E. D. The global burden of typhoid fever. *Bull WHO*, v. 82, p. 346-53, 2004.
5. EJRNAES, K. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 1776-81, 2006.
6. GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 2977-980, 1997.
7. IVANOFF, B. C. C. C. *The diagnosis, prevention, and treatment of typhoid fever.* Geneva: WHO, 2003.
8. KARIUKI, S. *et al.* Characterization of multidrug-resistant typhoid outbreaks in Kenya. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 1477-82, 2004.
9. KUBOTA, K. *et al.* Analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhi pulsed-field gel electrophoresis patterns associated with international travel. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 1205-9, 2005.
10. LING, J. M. *et al.* Molecular methods for the epidemiological typing of *Salmonella enterica* serotype Typhi from Hong Kong and Vietnam. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 292-300, 2000.

11. MAMMINA, C.; ALEO, A.; ROMANI, C.; NASTASI, A. Shigella sonnei biotype g carrying class 2 integrons in southern Italy: a retrospective typing study by pulsed field gel electrophoresis. *BMC Infect Dis*, v. 6, p. 117, 2006.
12. NAVARRO, F. *et al.* Molecular typing of Salmonella enterica serovar Typhi. *J Clin Microbiol*, v. 34, p. 2831-4, 1996.
13. QUINTAES, B. R. *et al.* Conventional and molecular typing of Typhi strains from Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paul*, v. 44, p. 315-9, 2002.
14. RAMOS, F. L. P. *Relatório de investigação epidemiológica de surto de febre tifóide no município de Mojú, Pará.* Belém: Instituto Evandro Chagas/FUNASA/MS, 2001.
15. SINHÁ, A. *et al.* Typhoid fever in children aged less than 5 years. *Lancet*, v. 354, p. 734-7, 1999.
16. TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 2233-9, 1995.
17. THONG, K. L. *et al.* Epidemiologic analysis of sporadic Salmonella Typhi isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1135-41, 1994.
18. THONG, K. L. *et al.* Analysis of Salmonella typhi isolates from Southeast Asia by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 1938-41, 1995.
19. THONG, K. L. *et al.* Molecular analysis of environmental and human isolates of Salmonella typhi. *Appl Environ Microbiol*, v. 62, p. 271-4, 1996.
20. THONG, K. L. *et al.* Increasing genetic diversity of Salmonella enterica serovar Typhi isolates from Papua New Guinea over the period from 1992 to 1999. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 4156-60, 2002.
21. VAZ, T. M. I. *et al.* Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 798-804, 2006.

Endereço para correspondência

Flávia Corrêa Bastos
Av. Conselheiro Furtado, 480/1.101
Batista Campos
CEP 66025-160 – Belém-PA
Tel.: (91) 3224-3097
e-mail: flavia_bastos@hotmail.com