



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE  
*Salmonella Typhi* ISOLADA DE CASOS DE FEBRE TIFÓIDE NO  
ESTADO DO PARÁ, NO PERÍODO DE 1970 A 2009.**

NATHALIA DANIELLY BORGES MARQUES

Belém-Pará  
2011

**NATHALIA DANIELLY BORGES MARQUES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE  
*Salmonella Typhi* ISOLADA DE CASOS DE FEBRE TIFÓIDE NO  
ESTADO DO PARÁ, NO PERÍODO DE 1970 A 2009.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Belém-Pará  
2011

Marques, Nathalia Danielly Borges

Caracterização molecular e fenotípica de *Salmonella* Typhi isolada de casos de febre tifóide no estado do Pará, no período de 1970 a 2009 / Nathalia Danielly Borges Marques; orientador, Edvaldo Carlos Brito Loureiro. – 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2011.

1. *Salmonella* Typhi. 2. Febre tifóide - Pará. 3. *Salmonella* Typhi – Aspectos moleculares. 4. Drogas – Resistência em microorganismos – Aspectos genéticos. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.9272

NATHALIA DANIELLY BORGES MARQUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Salmonella*  
Typhi ISOLADA DE CASOS DE FEBRE TIFÓIDE NO ESTADO DO  
PARÁ, NO PERÍODO DE 1970 A 2009.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro  
Instituto Evandro Chagas / SVS / MS

Banca Examinadora: Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dra. Antonia Benedita Rodrigues Vieira  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dra. Lena Lillian Canto de Sá  
Instituto Evandro Chagas / SVS / MS

Prof. Dr. Ricardo Ishak (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 10 de Maio de 2011

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a CIÊNCIA; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver AMOR nada serei. 1 Co 13.2.

Dedico esta dissertação à DEUS pelo amor, força e oportunidades encontradas nessa caminhada; à minha Avó e a minha Mãe pelo incentivo, carinho e apoio; pois, me ensinaram a fazer as melhores escolhas e me mostraram que a honestidade, o amor e o respeito são essenciais à vida. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todos os sonhos realizados e por mais esta grande conquista na minha vida, pois Ele é o grande responsável por todas as vitórias que tenho alcançado;

A minha Mãe-Avó Safira Borges, pelo companheirismo incansável, carinho, amor, dedicação, e por ter sido um presente de Deus na minha vida.

A minha Mãe Franci Borges pelo incentivo, carinho e apoio que demonstrou durante toda esta caminhada;

Aos meus irmãos Braian Borges e Aline Borges, que mesmo distantes estão torcendo pelo meu sucesso;

A todos os meus familiares que compartilharam este sonho comigo;

Ao meu grupo de estudo Nathalia Chamma e Márcia Bahia pelo incentivo, amizade e apoio numa época decisiva da minha vida, em especial agradeço a Márcia pelo companheirismo e troca de experiência no laboratório;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edvaldo Loureiro por todo o apoio, incentivo, ajuda, confiança e oportunidades oferecidas;

Ao Dr. Francisco Lúzio, pois sempre que precisei, ele estava disposto a me ajudar;

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular da SABMI, em especial a Dra. Karla Lima e Roberta Fusco pelas dicas recebidas;

A Dra. Lena Sá pelo treinamento no programa Bionumerics e por ceder o equipamento de foto-documentação para o registro de imagens do PFGE;

A Msc. Maurimélia Mesquita pela colaboração na correção do abstract;

Ao técnico José Caetano pelo treinamento nas técnicas de antibiograma;

A Daniela Rocha e Flávia Bastos pelo treinamento na PCR e PFGE;

A todas as pessoas que fazem parte da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas;

Ao Instituto Evandro Chagas pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa;

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo fornecida durante o mestrado;

Aos membros da banca do plano de qualificação Dr. Antônio Carlos Vallinoto e Dra. Karla Ribeiro pelas importantes contribuições;

Aos membros da banca examinadora Dra. Karla Ribeiro, Dra. Antônia Vieira e Dra. Lena Sá, pelas valiosas contribuições;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b>	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	10
<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 O GÊNERO <i>Salmonella</i>	13
1.2 FEBRE TIFÓIDE	18
1.2.1 <b>Considerações Gerais</b>	18
1.2.2 <b>Epidemiologia</b>	18
1.2.3 <b>Patogenia</b>	22
1.2.4 <b>Diagnóstico Laboratorial</b>	22
1.2.5 <b>Tratamento</b>	24
1.2.6 <b>Prevenção e Controle</b>	25
1.3 RESISTÊNCIA DA <i>Salmonella</i> Typhi AOS ANTIMICROBIANOS	25
1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ASSOCIADA AOS INTEGRONS NA <i>Salmonella</i> Typhi	26
1.5 GENOMA DA <i>Salmonella</i> Typhi	27
1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA DA <i>Salmonella</i> Typhi	30
1.7 MÉTODOS PARA A ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA <i>Salmonella</i> Typhi	31
1.8 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	32
1.9 OBJETIVOS	34
1.9.1 <b>Objetivo Geral</b>	34
1.9.2 <b>Objetivos Específicos</b>	34
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	35
2.1 AMOSTRAGEM	35
2.2 REIDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS	38
2.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	40
2.4 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)	42
2.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	45
2.5.1 <b>Semeadura das amostras</b>	45

2.5.2	<b>Preparação dos <i>Plugs</i> de PFGE</b> .....	45
2.5.3	<b>Digestão de DNA com Enzimas de Restrição</b> .....	46
2.5.4	<b>Aplicação das Amostras no Gel de Agarose</b> .....	46
2.5.5	<b>Condições para a Corrida Eletroforética</b> .....	47
2.5.6	<b>Interpretação e Análise de Dados</b> .....	47
2.6	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	49
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	50
3.1	ANÁLISE BIOQUÍMICA E SOROLÓGICA DE <i>Salmonella</i> Typhi.....	50
3.2	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DA <i>Salmonella</i> Typhi AOS ANTIMICROBIANOS.....	51
3.3	DETECÇÃO DO GENE <i>viaB</i> ENVOLVIDO NO MECANISMO DE VIRULÊNCIA DA <i>Salmonella</i> Typhi.....	53
3.4	DETECÇÃO DOS INTEGRONS DE CLASSE 1 E 2 RELACIONADOS A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	54
3.5	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA.....	55
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70
	<b>APÊNDICE 1</b> .....	87

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1 - Reações típicas da <i>Salmonella spp.</i> e <i>Salmonella Typhi</i> na identificação bioquímica.....	14
Quadro 2 - Distribuição do gênero <i>Samonella</i> em espécies, subespécies e número de sorovares, segundo Guibourdenche <i>et al.</i> , 2010.....	15
Quadro 3 - Quadro 3 - Classificação dos sorotipos ou sorovares de <i>Salmonella</i> segundo o esquema abreviado de White-Kauffmann-Le Minor com base na sua composição antigênica.....	16
Quadro 4 - Distribuição de casos de febre tifóide em diferentes locais e períodos.....	21
Quadro 5 - Agentes antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão e interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana.....	40
Quadro 6 - Agentes antimicrobianos testados pelo sistema automatizado Vitek 2 e interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana.....	41
Quadro 7 - Descrição dos genes e iniciadores empregados na reação de PCR	42
Quadro 8 - Condições de amplificação na Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> Int1, Int2 e vi.....	44
Quadro 9 - Enzima de restrição usada para digestão de DNA genômico da <i>S. Typhi</i> pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	46
Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa da suscetibilidade aos antimicrobianos de 151 <i>S. Typhi</i> isoladas no Estado do Pará.....	51
Quadro 10 - Período, procedência e perfil de resistência a Nitrofurontóina de 151 <i>S. Typhi</i> isoladas no Estado do Pará.....	52
Quadro 11 - Características das <i>S. Typhi</i> pertencentes ao <i>Cluster A</i> .....	56

Quadro 12 - Características das <i>S. Typhi</i> pertencentes ao <i>Cluster B</i> .....	59
Quadro 13 - Características das <i>S. Typhi</i> pertencentes ao <i>Cluster C</i> .....	62
Quadro 14 - Características das <i>S. Typhi</i> pertencentes ao <i>Cluster D</i> .....	63
Quadro 15 - Características das <i>S. Typhi</i> pertencentes ao <i>Cluster E</i> .....	63
Quadro 16 - Características das <i>S. Typhi</i> não agrupadas em <i>Clusters</i> .....	63

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Visualização da <i>Salmonella</i> Typhi através da técnica de imunofluorescência (Fonte: Baker <i>et al.</i> , 2007).....	13
<b>Figura 2</b> - Mapa do genoma circular de Ty2.....	29
<b>Figura 3</b> - Estado do Pará com destaque para os 35 municípios investigados neste estudo. Fonte: LabGeo IEC/SVS/MS.....	36
<b>Figura 4</b> - Distribuição espacial das 151 amostras de <i>Salmonella</i> Typhi isoladas a partir de 51 hemoculturas e 100 coproculturas no Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Evandro Chagas no período de 1970 a 2009 em 35 municípios do Estado do Pará.....	37
<b>Figura 5</b> – Fluxograma da reidentificação e manutenção das amostras de <i>Salmonella</i> Typhi isoladas no Estado do Pará no período de 1970 a 2009..	39
<b>Figura 6</b> – Fluxograma da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para a análise do DNA genômico da <i>S. Typhi</i> .....	48
<b>Figura 7</b> - Série bioquímica usada no presente estudo para identificação da <i>Salmonella</i> Typhi.....	50
<b>Figura 8</b> - Eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização do produto de amplificação usando o iniciador vi.....	53
<b>Figura 9</b> - Perfil de macro-restrição do genoma de <i>S. Typhi</i> através da técnica Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	55
<b>Figura 10</b> - Dendograma mostrando o grupamento pelo método UPGMA e os perfis de macrorestrição (enzima <i>XbaI</i> ) definidos por PFGE de 151 amostras de <i>S. Typhi</i> .....	57

## RESUMO

A *Salmonella* Typhi é o agente etiológico da febre tifóide, uma doença infecciosa, sistêmica, que constitui importante problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento da África, Ásia, América Central e do Sul. Amostras de *Salmonella* Typhi isoladas de casos clínicos no período de 1970 a 2009 no Estado do Pará foram caracterizadas por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado através dos métodos manual e automatizado. Foi empregada a técnica de Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) para a pesquisa das integrases de classe 1 e 2 e do fator de virulência Vi. Em 151 amostras pôde-se observar 68 diferentes pulsotipos, sendo 66 deles agrupados em 5 clusters. As amostras independente de sua procedência, fonte de isolamento ou ano, apresentaram elevada similaridade genética que variou de 80 a 100%. Verificou-se resistência (1,99%) e resistência intermediária (6,62%) somente à nitrofurantoína, em nenhuma amostra foi detectado integrase de classe 1 e 2, demonstrando, que, no Estado do Pará, as cepas circulantes não apresentam multi-resistência como observado em várias regiões do mundo. Foram encontradas 4 (2,65%) amostras Vi-negativo, que pode ser devido ao longo período de armazenamento, pois a ilha de patogenicidade SPI-7 é geneticamente instável e pode ser perdida após sucessivos repiques.

## ABSTRACT

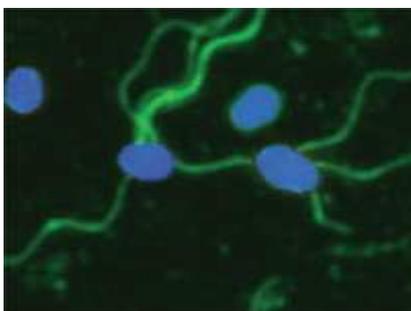
*Salmonella* Typhi is the causative agent of typhoid fever, a systemic infectious disease which is an important public health problem mainly in developing countries from Africa, Asia, America Central and South. Samples of *Salmonella* Typhi isolated from clinical cases between the period from 1970 to 2009 in the state of Pará were characterized by the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique. The profile of antimicrobial susceptibility has been performed using manual and automated methods. Also, Polymerase Chain Reaction (PCR) has been used to the detection of class 1 and 2 integrons and the virulence factor Vi. In 151 samples, we could observe 68 different pulse types, with 66 pulse types grouped into five clusters. The samples, regardless their origin, source of isolation or year, have shown high genetic similarity ranging from 80 to 100%. Resistance (1.99%) and intermediate resistance (6.62%) only against nitrofurantoin has been noticed, integrons have not been found in class 1 and 2 related to resistance, demonstrating that, in the State of Para, the phenomenon of resistance and multidrug resistance found in several regions of the world has not occurred yet. We found four (2.65%) Vi-negative samples, which may be so due to the long storage period, as the pathogenicity island SPI-7 is genetically unstable and may be lost after repeated subcultures.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O GÊNERO *Salmonella*

A *Salmonella* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, conhecida mundialmente como o agente causador de toxi-infecções alimentares em seres humanos (Lan *et al.*, 2009).

O gênero *Salmonella* compreende bacilos Gram-negativos com diâmetro em torno de 0,7 - 1,5 x 2,0 – 2,5 µm, não esporulados; em geral móveis com flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*; possuem temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C; são anaeróbios facultativos; formam colônias que medem cerca de 2 a 4 mm de diâmetro; apresentam os testes da oxidase e Voges-Proskauer negativos; reduzem nitrato a nitrito; fermentam glicose e outros carboidratos com produção de ácidos, produzem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S); utilizam o citrato como única fonte de carbono e, geralmente, são lisina e ornitina descarboxilase positivas (Winn Jr *et al.*, 2008).



**Figura 1** – Visualização da *Salmonella Typhi* através da técnica de imunofluorescência. (Fonte: Baker *et al.*, 2007).

A *Salmonella Typhi* se diferencia dos demais sorovares por meio de características bioquímicas e sorológicas (Ewing, 1986). A *S. Typhi* fermenta glicose sem produção de gás, é citrato negativo, produz H<sub>2</sub>S em pequena quantidade em comparação aos demais sorovares, bem como, apresenta o teste da ornitina descarboxilase negativo (Brenner *et al.*, 2005). As principais

provas de identificação bioquímica para *Salmonella spp.* e *S. Typhi* estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Reações típicas da *Salmonella spp.* e *Salmonella Typhi* na identificação bioquímica.

Identificação Bioquímica	<i>Salmonella spp</i>	<i>Salmonella Typhi</i>
Ágar triplice açúcar ferro (TSI)	Al/Acg	Al/Ac
Sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	Positivo	Pequena quantidade*
Uréia	Negativo	Negativo
Motilidade	Positiva*	Positiva*
Indol	Negativo	Negativo
Citrato	Positivo	Negativo
Lisina	Positivo	Positivo
Ornitina	Positivo	Negativo

Al= Alcalino (Ápice vermelho); Ac= Ácido (Base amarelo); g= produção de gás (CO<sub>2</sub>). \*Esta reação ocorre em 97% das cepas. Positivo = Esta reação ocorre em 90% ou mais das cepas. Negativo = Esta reação ocorre em 90% ou mais das cepas. Fonte: Brenner *et al.*, 2005.

Na taxonomia atual os nomes dos sorovares não devem estar em itálico e a primeira letra deve ser maiúscula, obedecendo a seguinte citação: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium (Grimont & Weill, 2007).

Para os nomes dos sorovares designados pelas fórmulas antigênicas na espécie *enterica*, escreve-se da seguinte forma: (a) designação da subespécie, (b) antígeno somático mais dois pontos, (c) antígeno flagelar (de fase 1 mais dois pontos e fase 2 quando presente), por exemplo: *Salmonella* sorotipo IV 45:g,Z<sub>51</sub>:-. Para a fórmula antigênica dos sorovares na espécie *bongori*, segue-se o exemplo: S. V 61:z<sub>35</sub>:- (Brenner *et al.*, 2000).

Classificações baseadas na técnica de hibridização do DNA dividem o gênero *Salmonella* em duas espécies distintas *S. enterica* e *S. bongori*, a *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies e nela encontram-se cerca de 99,5% dos sorovares mais frequentemente isolados (Patrick *et al.*, 2007), ver o Quadro 2.

Quadro 2 - Distribuição do gênero *Samonella* em espécies, subespécies e número de sorovares, segundo Guibourdenche *et al.*, 2010.

Gênero	Espécie	Subespécie	Número de sorovares
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	1547
		<i>salamae</i> (II)	513
		<i>arizonae</i> (IIIa)	100
		<i>diarizonae</i> (IIIb)	341
		<i>houtenae</i> (IV)	73
		<i>indica</i> (VI)	13
	<i>bongori</i>	Subespécie V	23
Total			2610

Na *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, os sorovares são designados por um nome geralmente indicativo de doenças associadas, especificidade do hospedeiro ou origens geográficas. Algumas salmonelas clinicamente importantes como a *S. Typhi* foram denominadas de acordo com a doença, outras, como a *S. Abortusovis* foram correlacionadas com a doença e/ou animal a partir do qual foram isoladas, ou mesmo pela região geográfica onde o organismo foi primeiramente isolado, como a *S. London* e *S. Panama* (Patrick *et al.*, 2007).

Os sorovares da subespécie *enterica*, representam até 98% dos isolados de processos entéricos e extra-intestinais do homem, com sorovares distribuídos principalmente entre os grupos sorológicos O:4 (B), O:6, 7, 8 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), O:9 (D<sub>1</sub>) e O:3, 10, 15 e 19 (E<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>) do esquema de White-Kauffmann-Le Minor. Os sorovares da *Samonella enterica* subespécie *enterica* e *Salmonella enterica* subespécie *salamae* acometem animais homeotérmicos, e os demais sorovares, com destaque para IV e VI, são detectados em animais de sangue frio e no meio ambiente (Hofer & Hofer, 2005).

A caracterização sorológica do gênero *Salmonella* tem como base a identificação dos antígenos “O” (somáticos), “H” (flagelares) e “Vi” (capsular), levando em consideração ao esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Quadro 3), cujas fórmulas antigênicas são identificadas com letras e números. O antígeno O reflete a variação do polissacarídeo e o antígeno H, reflete a variação da flagelina, que possui natureza protéica (Parry *et al.*, 2002).

O componente LPS da membrana externa possui uma porção polissacarídica composta de açúcares, denominados polissacarídeos O, que atuam como antígenos. No locus *rfb* do cromossomo da *Salmonella*, são encontrados genes responsáveis pela síntese e variabilidade do antígeno O (Fierer & Guiney, 2001).

Quadro 3 - Classificação dos sorotipos ou sorovares de *Salmonella* segundo o esquema abreviado de White-Kauffmann-Le Minor com base na sua composição antigênica.

Sorotipo	Grupo	Fórmula Antigênica		
		Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
S. Paratyphi A	O:2 (A)	1,2,12	a	[1,5]*
S. Paratyphi B	O:4 (B)	1,4,[5],12	b	1,2
S. Typhimurium		1,4,[5],12	i	1,2
S. Agona		1,4,12	f,g,s	[1,2]
S. Derby		1,4,[5],12	f,g	[1,2]
S. Saintpaul		1,4,[5],12	e,h	1,2
S. Choleraesui	O:7 (C <sub>1</sub> )	6,7	c	1,5
S. Oranienburg		6,7,14	m,t	[z <sub>57</sub> ]
S. Infantis		6,7,14	r	1,5
S. Newport	O:8 (C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> )	6,8,20	e,h	1,2
S. Typhi	O:9 (D <sub>1</sub> )	9,12[Vi]	d	-
S. Enteritidis		1,9,12	g,m	-
S. Anatum	O:3,10 (E <sub>1</sub> )	3,10[15] [15,34]	e,h	1,6

[ ]\* = pode ou não ocorrer. Fonte: Ferreira & Campos, 2008.

Existe uma grande variação na porção central dos genes da flagelina, essa variação é usada para definir antígenos flagelares específicos. A maioria das salmonelas tem dois genes distintos da flagelina, a expressão deles é

alternada em uma taxa de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ , de forma que apenas um alelo é expresso pela bactéria (Fierer & Guiney, 2001).

O Vi é um antígeno de superfície encontrado apenas em três sorovares de *Salmonella* (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*), possui importância na diferenciação sorológica do sorovar, bem como, apresenta-se como mecanismo de defesa bacteriana durante a infecção (Ferreira & Campos, 2008).

Os sorovares de *Salmonella* são ubiqüitários e podem infectar humanos e animais. Alguns sorovares de *Salmonella* são adaptados exclusivamente ao homem, como a *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, *B* e *C* que usualmente causam doenças graves como febres tifóide e paratifóides (Brenner *et al.*, 2005). Os sorovares *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* estão relacionados à bacteremia ao invés de diarreia (Fierer & Guiney, 2001). Determinados sorovares são adaptados a uma espécie animal, como a *S. Gallinarum* em aves e a *S. Abortusovis* em carneiros, enquanto que outros sorovares como a *S. Typhimurium* e a *S. Enteritidis* podem causar infecções tanto no homem como em diferentes espécies de animais, atuando como reservatórios naturais da infecção humana, o que confere à salmonelose o caráter de zoonose, tornando-a responsável por quadros de gastroenterites (Ferreira & Campos, 2008).

A salmonelose é transmitida de pessoa a pessoa, sem um hospedeiro intermediário, por meio da contaminação da água e alimentos crus ou mal cozidos, como: carne bovina, suíno, aves, ovos, leite e derivados, e frutos do mar. Veterinários e trabalhadores de granjas e fazendas que possuem maior contato com animais infectados, também podem adquirir a doença; e em hospitais pode ocorrer a transmissão interpessoal (Shinohara *et al.*, 2008).

As gastroenterites são quadros clínicos curtos causados por *Salmonella* não-Typhi, com período de incubação de 12 a 72 horas, indicando que a ativação da resposta imune adaptativa contribui para o término dos sintomas (Raffatellu *et al.*, 2008).

A *S. Enteritidis* é o sorovar mais comum associado à infecção de origem alimentar em humanos por *Salmonella* em todo o mundo, sobretudo na

Europa onde representa 85% dos casos de *Salmonella*, Ásia (38%), América Latina e Caribe (31%) (Galanis *et al.*, 2006). Desde a primeira pandemia relatada em 1980, ela tem emergido como um dos principais patógenos associados à transmissão da *Salmonella* através de ovos contaminados (Galanis *et al.*, 2006).

Os sorovares que causam a febre tifóide e paratifóide destacam-se dentro do gênero como importantes problemas de saúde pública, principalmente, nos países em desenvolvimento onde a assistência à saúde e as condições socioeconômicas são limitadas (Kanungo *et al.*, 2008).

## 1.2 FEBRE TIFÓIDE

### 1.2.1 Considerações Gerais

Em 1884, o bacteriologista alemão Gaffky, conseguiu isolar o bacilo tífico a partir de fragmentos de baço de pacientes infectados. Estudos subsequentes foram realizados, obtendo-se dois grandes avanços na identificação sorológica e no isolamento da bactéria, com a soroaglutinação de Widal em 1896 e a hemocultura de Schotmüller em 1900, respectivamente (Ledermann, 2003).

No início do século XX, Schotmüller e posteriormente Bryon e Kyser propuseram a separação dos agentes das febres tíficas (febre tifóide e febre paratifóide) (Ledermann, 2003). A definição do nome *Salmonella* deu-se em homenagem ao bacteriologista americano Daniel Elmer Salmon.

A febre tifóide é uma doença infecciosa e sistêmica causada pela *S. Typhi*, que se caracteriza por febre alta e sintomas gastrointestinais. Apresenta distribuição mundial, sendo os países em desenvolvimento os mais acometidos pela doença, que está associada ao saneamento básico e condições de higiene pessoal e ambiental precários. No Brasil, a doença é de notificação compulsória, ocorre de forma endêmica, e acomete principalmente as regiões Norte e Nordeste (Brasil, 2007).

### 1.2.2 Epidemiologia

A febre tifóide é um importante problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento da África, Ásia, América

Central e do Sul. A cada ano, estima-se que ocorram 22 milhões de casos e 200.000 óbitos de febre tifóide em todo o mundo (CDC, 2009).

Em um estudo realizado na Ásia entre os anos de 2001 e 2003, em cinco países considerados endêmicos para a febre tifóide, foram avaliadas 441.435 pessoas que estavam sob um sistema de vigilância pré-vacinação, sendo que destas, 21.874 apresentaram febre com duração igual ou superior a três dias, e dentre estas, 475 pessoas apresentaram hemocultura positiva para *S. Typhi*. A ocorrência da doença foi maior na Índia, Paquistão e Indonésia (Ochiai *et al.*, 2008).

Hotez & Kamath (2009) realizaram um levantamento epidemiológico na África Subsaariana sobre doenças tropicais negligenciadas, as infecções helmínticas foram as mais comuns, seguido das doenças bacterianas, com destaque para a febre tifóide que foi uma das principais doenças com a prevalência subestimada nesses países.

Na Europa, o número de casos de febre tifóide tem diminuído nos últimos anos. De 1995 a 2004 a maior proporção de casos da doença (31%) foi observada na Itália. Rizzo *et al.* (2008), realizou um levantamento dos casos de febre tifóide ocorridos entre 2000 e 2006 na Itália, no qual, os dados mostraram uma tendência decrescente da febre tifóide no país (de 1,1/100.000 em 2000 para 0,4/100.000 habitantes em 2006).

Nos países desenvolvidos os casos de febre tifóide ocorrem principalmente devido a viajantes que retornam de áreas endêmicas (Lynch *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, um estudo realizado entre 1994 e 1999, detectou 1.393 casos de febre tifóide, sendo 74% relacionados a casos importados (Olsen *et al.*, 2003). Posteriormente, Lynch *et al.* (2009), analisando dados de 1999 a 2006, encontrou 1.902 casos de febre tifóide, com cerca de 79% associados a casos importados. Na Suíça, um estudo realizado entre 1993 e 2004, identificou 208 casos da doença, com 88,5% associados a viagens recentes (Keller *et al.*, 2008).

Nos países Latino-americanos, verificamos que durante décadas os índices de febre tifóide no Chile variaram entre 40 e 50 casos/100.000 habitantes. Em 1977 houve o início de uma epidemia que perdurou dez anos,

nesse período, as taxas chegaram a alcançar o índice de 120 casos/100.000 habitantes, anos mais tarde, em 1997, houve o declínio da doença com valores abaixo de 10 casos/100.000 habitantes (Fica *et al.*, 2001). Em 2003 foram 3,7 casos de febre tifóide por 100.000 habitantes no Chile, diminuição indicada através de um estudo epidemiológico realizado por Luque *et al.* (2006).

No Brasil, há um declínio dos coeficientes de incidência e letalidade por febre tifóide entre os anos de 1981 e 2004. Em São Paulo a incidência de febre tifóide diminuiu consideravelmente de 1960 quando apresentava mais de 600 casos para menos de 50 casos em 2004 (DDTHA, 2005).

Entre 1998 e 2008 foram 4.406 casos confirmados de febre tifóide em todo o Brasil, destes 2.094 ocorreram na região Norte (Brasil, 2008b). Em 2009 foram notificados 318 casos de febre tifóide em todo o país (Datasus, 2011). Quando analisadas somente as regiões Norte e Nordeste, verificam-se coeficientes mais elevados da doença, devido à precariedade das condições sanitárias e ao abastecimento de água inadequado (Brasil, 2007; Brasil, 2008a).

Na década de 1980, o Estado do Pará atingiu o maior número de casos de febre tifóide da região amazônica. Em 1985 foram 281 casos notificados da doença (Santos *et al.*, 1992). No final da década de 1980, ocorreram surtos nos municípios de Marabá e Abaetetuba com a média de 20 casos/ano (Ramos, 2005).

De acordo com registros no período de 1993 a 1997, na região amazônica, o Instituto Evandro Chagas (IEC) atendeu e diagnosticou 85 casos de febre tifóide, onde 57 (66,3%) foram originários de Belém, 18 (20,9%) do interior do Estado do Pará e 11 (12,8%) provenientes de outros estados, incluindo 9 casos do município de Tarauacá, estado do Acre. A doença apresentou distribuição sazonal com 75,6% dos casos acontecendo entre os meses de julho a dezembro (Ramos & Lins-Lainson, 1997).

Surtos de maiores proporções foram relatados em Óbidos, Mojú e Anajás. No município de Óbidos, o surto de febre tifóide ocorreu no ano de 1997, com 61 casos identificados na localidade de Cipoal situada à Noroeste do município. No surto registrado em Mojú no ano de 1999 detectou-se 72

casos de febre tifóide. Em 2001, no município de Anajás foram identificados 79 casos da doença (Ramos *et al.*, 1998; Ramos, 1999; 2001). Outros surtos de menor dimensão foram relatados em Breves, Barcarena e Igarapé Miri. Ramos (2005) relatou 443 casos de febre tifóide diagnosticados pelo IEC no período entre 1987 e 2004 com distribuição sazonal da doença.

No Estado do Pará, no período de 1991 a 2008, identificaram-se 835 casos de salmonelose em 43 municípios, destes 492 (58,9%) casos de febre tifóide. Dos 47 sorovares de *Salmonella* identificados, a *S. Typhi* foi o mais frequente com 77,8%, demonstrando assim a importância epidemiológica da febre tifóide na região (Loureiro *et al.*, 2010). O Quadro 4 mostra resumidamente a distribuição dos casos de febre tifóide em diferentes regiões.

Quadro 4 - Distribuição de casos de febre tifóide em diferentes locais e períodos

Local	Período	Número de casos	Referência
Ásia	2001 a 2003	475 (441.435 sistema de vigilância/ 21.874 com febre)	Ochiai <i>et al.</i> , 2008
Itália	2000	1,1/100.000 hab.	Rizzo <i>et al.</i> , 2008
	2006	0,4/100.000 hab.	
EUA	1999 a 2006	1.902 (79% viajantes)	Lynch <i>et al.</i> , 2009
Chile	Durante décadas	40 a 50/100.000 hab.	Luque <i>et al.</i> , 2006
	2003	3,7/100.000 hab.	
Brasil	1998 a 2008	4.406 (2.094 no Norte)	Brasil, 2008b
Região Amazônica	1993 a 1997	85 casos	Ramos & Lins-Lainson, 1997
Óbidos, Moju, Anajás	1997, 1999 e 2001 respectivamente	61, 72 e 79 casos respectivamente	Ramos <i>et al.</i> , 1998; Ramos, 1999; Ramos, 2001.

### 1.2.3 Patogenia

O ser humano é o único reservatório e hospedeiro natural da *S. Typhi*. A transmissão ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes ou urina de doentes, portadores ou oligossintomáticos, a dose infectante média é de  $10^3$  a  $10^6$  bactérias (Lambertucci *et al.*, 2005).

Após a ingestão, as bactérias passam através do piloro e chegam ao intestino delgado, a invasão ocorre em toda a extensão do intestino delgado, preferencialmente na região ileocecal. Os bacilos multiplicam-se nos tecidos linfóides locais (placas de Peyer), induzindo os enterócitos e macrófagos a realizar a fagocitose, processo conhecido como endocitose mediada pela bactéria, ocorre linfangite e necrose multifocal, pela ação de endotoxinas que aumentam a resposta inflamatória local nos tecidos onde a *Salmonella* se multiplica. Alguns bacilos permanecem nos macrófagos do intestino delgado, enquanto outros bacilos são drenados pelos linfonodos mesentéricos, onde ocorre mais endocitose pelos macrófagos, acredita-se que essa drenagem seja o fator pelo qual a *Salmonella Typhi* alcança a corrente sanguínea (WHO, 2003; Lambertucci *et al.*, 2005).

Como resultado da bacteremia primária, o patógeno dissemina-se por todo o organismo, e atinge preferencialmente os órgãos do sistema reticulo endotelial (baço, fígado, medula óssea, etc.), onde residem durante 8 a 14 dias (período de incubação). O período de incubação depende da quantidade do inóculo e fatores do hospedeiro (WHO, 2003; Lambertucci *et al.*, 2005; Ferreira & Campos, 2008). Na bacteremia secundária começam os sintomas clínicos. A vesícula biliar é um órgão frequentemente atingido. As manifestações clínicas incluem adenomegalia, pancitopenia, hepatoesplenomegalia (Lambertucci *et al.*, 2005), além disso, dor abdominal, febre em torno de 39 °C e sintomas inespecíficos como calafrios, constipação, diarreia, náuseas e tosse também podem ocorrer (Kanungo, 2008).

### 1.2.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da febre tifóide baseia-se no isolamento e identificação do agente etiológico. Usualmente são empregados exames laboratoriais como a

hemocultura, coprocultura e Reação de Widal. Outras técnicas como a mielocultura, urocultura e o diagnóstico molecular também podem ser realizadas (Brasil, 2008a).

A hemocultura é um método de diagnóstico importante na primeira semana da doença, com positividade de 80%. O material biológico usado é o sangue que deve ser coletado o mais precocemente possível a partir do início dos sintomas. Quando proveniente de um indivíduo adulto são necessários 10 mL da amostra, se for uma criança são necessários de 3 a 5 mL. Recomenda-se coletar pelo menos 3 amostras com intervalo de 30 minutos entre cada uma. É importante que o material seja coletado antes da antibioticoterapia e de forma asséptica para não haver interferência no resultado do exame (Lambertucci *et al.*, 2005; Brasil, 2008a).

A coprocultura é indicada a partir da segunda a quinta semanas da doença, sendo particularmente útil no controle de cura dos pacientes e na detecção dos portadores crônicos de *S. Typhi*. Na realização do exame, o material biológico (fezes) deve ser coletado *in natura* e encaminhado ao laboratório em, no máximo, duas horas, até a realização do exame. Pode ser utilizado meio de transporte Cary & Blair caso seja necessário um maior período entre a coleta e a chegada da amostra para a análise laboratorial (Brasil 2007, Brasil, 2008a).

A reação de Widal trata-se de exame sorológico auxiliar para o diagnóstico da febre tifóide. O teste baseia-se na detecção de aglutininas anti-O e anti-H no soro de pacientes suspeitos. O exame possui limitações na sensibilidade e especificidade. Podem ocorrer resultados falso-positivos devido à reação cruzada com aglutininas formadas contra outros sorovares do grupo D de *Salmonella*, vacinação anti-tífica, e valores de corte muito baixos para os títulos de aglutininas. As reações falso-negativas também podem ocorrer pelo uso de cloranfenicol que pode interferir na formação das aglutininas específicas (Lambertucci *et al.*, 2005).

A mielocultura é o exame mais sensível (90% de sensibilidade) e não sofre influência da antibioticoterapia. Entretanto, sua limitação está na forma invasiva e desconfortável com a qual o método é empregado, além da

dificuldade na operacionalização e da necessidade de pessoal médico com treinamento específico para punção medular (Brasil, 2008a).

A urocultura possui positividade máxima na terceira semana da doença e apresenta valor diagnóstico limitado, possui sensibilidade em torno de 15% a 30%, e pacientes com anormalidades no trato urinário podem excretar a bactéria por longos períodos (Lambertucci *et al.*, 2005; Brasil, 2008a).

Outros exames atualmente usados para o diagnóstico são o ensaio imunoenzimático (ELISA), e métodos moleculares baseados na amplificação do DNA, como a PCR multiplex e o PCR em Tempo Real, pois são métodos mais sensíveis, específicos, rápidos e reprodutíveis (Brasil, 2008a; Fadeel *et al.*, 2004; Lim & Thong, 2009; Massi *et al.*, 2005).

### **1.2.5 Tratamento**

O tratamento é preferencialmente ambulatorial. O antibiótico de escolha dependerá do quadro clínico da doença e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Em 1948, foi introduzido o cloranfenicol para o tratamento da febre tifóide. Com o surgimento de falhas no tratamento, resistência e efeitos colaterais como a toxicidade medular, que pode se manifestar sob a forma de anemia (dose-dependente) ou anemia aplástica (reação idiossincrásica); passou-se então a optar por outros medicamentos como a ampicilina e o cotrimoxazol, no entanto também há relatos de resistência a esses medicamentos (Kariuki *et al.*, 2000; Arjyal & Pandit, 2008; Brasil, 2008a).

As fluoroquinolonas, as cefalosporinas de terceira geração e a azitromicina têm sido o tratamento de escolha para casos de febre tifóide multi-droga resistentes (Thaver *et al.*, 2005). As fluoroquinolonas são antibacterianos de amplo espectro, penetram nos macrófagos e alcançam altas concentrações na bile. As cefalosporinas de terceira geração têm sido úteis em casos de septicemia bacteriana (Arjyal & Pandit, 2008). A azitromicina é um medicamento novo no tratamento da febre tifóide, ela atua em casos de resistência ao ácido nalidíxico e em cepas multi-droga resistentes (Parry *et al.*, 2007).

Além disso, outras drogas também são usadas no tratamento de pacientes com febre tifóide, como: sulfametoxazol – trimetoprim, amoxicilina e quinolonas (Brasil, 2008a).

### 1.2.6 Prevenção e Controle

A febre tifóide tem como reservatório único o ser humano, e a transmissão da doença ocorre pela via fecal-oral, desta forma as principais medidas preventivas incluem água potável, alimentos seguros, higiene pessoal e condições sanitárias adequadas (Bhan *et al.*, 2005). No entanto, essas medidas exigem um enorme investimento, tornando-se uma tarefa quase inatingível, principalmente em países com recursos escassos que acabam sendo os mais necessitados. De forma mais abrangente os casos devem ser diagnosticados precocemente, seguido da oferta de tratamento imediato e adequado. É válido ressaltar que um forte sistema de vigilância deve ser posto em prática para a detecção precoce de casos e portadores (Kanungo *et al.*, 2008).

As vacinas contra a febre tifóide não são eficazes no combate a surtos por não apresentarem um alto poder imunogênico e por conferirem imunidade de curta duração (Brasil, 2008a). Existem duas vacinas para febre tifóide, uma baseada no polissacarídeo Vi, e outra baseada em um conjunto de células vivas atenuadas; estão atualmente licenciadas, no entanto possuem eficácia moderada (Bhan *et al.*, 2005).

### 1.3 RESISTÊNCIA DA *Salmonella* Typhi AOS ANTIMICROBIANOS

A obtenção de informações sobre o perfil de suscetibilidade da *S. Typhi*, é importante para escolha coerente da terapia antimicrobiana adequada mediante o surgimento de resistência a vários medicamentos de escolha para o tratamento da febre tifóide.

Após dois anos da introdução do cloranfenicol para o tratamento da febre tifóide, em 1948, surgiram relatos de resistência ao antimicrobiano. No entanto, somente em 1972, a resistência ao cloranfenicol tornou-se um problema de maior escala. Surtos de febre tifóide foram relatados na Tailândia,

México, Índia, Vietnã, Coréia e Peru, e os isolados de *S. Typhi* foram resistentes a sulfonamida, tetraciclina e estreptomicina (Parry *et al.*, 2002).

No período de 1980 a 1990 surgiram cepas de *S. Typhi* resistentes a todos os medicamentos de primeira linha usados no tratamento da febre tifóide (cloranfenicol, trimetoprim, sulfametoxazol e ampicilina), por ocasião de surtos na Índia, Paquistão, Bangladesh, Vietnã, Oriente médio e África (Parry *et al.*, 2002).

Cepas multi-droga resistentes de *S. Typhi* vêm se tornando um grande problema na Ásia (Parry *et al.*, 2007). Em 2008, na Índia, o estudo de Kumar *et al.* (2009) com 50 amostras de *S. Typhi* demonstrou que 48 (96%) foram resistentes ao ácido nalidíxico, a frequência foi considerada elevada quando comparada com o estudo realizado por Kadhivaram *et al.* (2005) entre 2001 e 2003, com 78% resistência ao antimicrobiano, fato que demonstra o aumento da resistência ao ácido nalidíxico na região. Em 1999, 2002 e 2005, cepas de *S. Typhi* isoladas na Índia apresentaram reduzida sensibilidade à fluoroquinolonas, cloranfenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, ácido nalidíxico e cefalosporinas (Kumar *et al.*, 2008).

Na Amazônia brasileira foi identificado um caso de um jovem portador de *S. Typhi* resistente ao cloranfenicol, medicamento de primeira escolha para o tratamento da febre tifóide no Brasil em função do seu baixo custo e terapêutica satisfatória (Alecrim *et al.*, 2002).

#### 1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ASSOCIADA AOS INTEGRONS NA *Salmonella Typhi*

Os integrons são elementos que contém o gene *int* (gene que codifica a integrase), um sítio de recombinação adjacente *attI*, e que eventualmente podem apresentar cassetes gênicos. Os integrons de resistência carregam principalmente cassetes gênicos que codificam resistência aos antibióticos e desinfetantes, e estão localizados em cromossomos ou plasmídeos (Fluit & Schmitz, 2004).

Os cassetes gênicos consistem em gene único e em um elemento base 59 (contém sequências de repetições invertidas) localizado *dowstream* a região

codificante do gene, que na maioria das vezes é reconhecido pela recombinase sítio específica codificada pelo integron (IntI). Os cassetes gênicos podem existir como moléculas circulares livres e são transcritos apenas quando capturados e inseridos em um integron (Recchia & Hall, 1995).

Os integrons são frequentemente encontrados como parte de transposons Tn21, Tn1403, Tn1404, Tn1696, Tn1412 e Tn2000. Esses transposons podem estar localizados em cromossomos ou plasmídeos (grandes plasmídeos conjugativos pertencentes a grupos IncFI, IncFII ou IncL/M) (Fluit & Schmitz, 2004).

Os integrons de classe 1 e 2 estão associados a uma variedade de cassetes gênicos de resistência (Rowe-Magnus & Mazel, 2002). Pai *et al.* (2003) mostrou em um estudo realizado na Korea no ano de 1999, isolados de *S. Typhi* multi-droga resistentes associados ao integron de classe 1 contendo seis cassetes gênicos de resistência, ainda na Ásia, Ploy *et al.* (2003) detectou 18 cepas resistentes (15 a trimetoprim e 3 a espectomicina e estreptomicina) com a presença do integron de classe 1.

### 1.5 GENOMA DA *Salmonella* Typhi

O genoma da *S. Typhi* foi descrito com a análise de dois isolados, uma cepa clássica Ty2 (isolada originalmente em 1900) e uma cepa CT18 multirresistente isolada no Vietnã, em 1992. A comparação dos cromossomos da *S. Typhi* CT18 e Ty2 demonstram um notável grau de conservação (Baker & Dougan, 2007). A Figura 2 mostra a comparação do genoma de Ty2 com CT18.

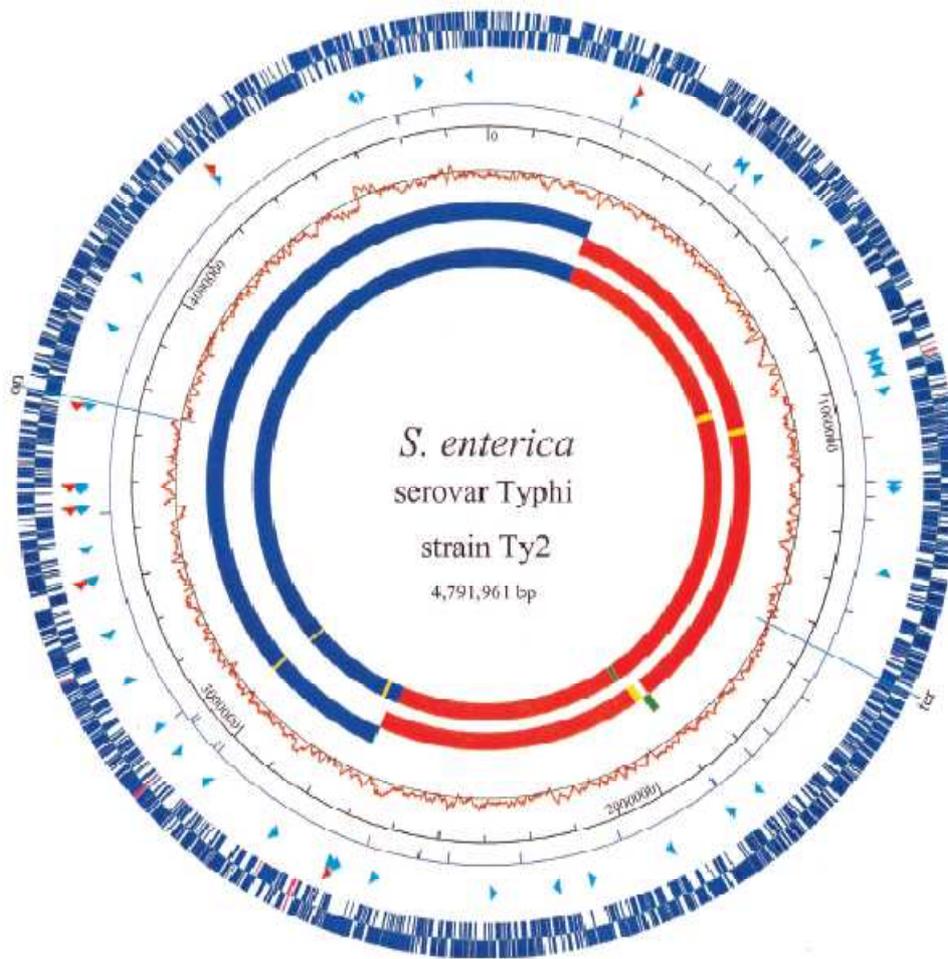
No entanto, algumas diferenças são observadas entre os isolados, a cepa patogênica de *S. Typhi* Ty2 foi isolada antes do surgimento de resistência a drogas em 1970, portanto não contém plasmídeos, em contraste com a cepa CT18 que carrega cassetes resistentes a múltiplas drogas em um grande plasmídeo e contém outro grande plasmídeo estreitamente relacionado com pMT1 da *Yersinia pestis*.

O genoma do Ty2 consiste de um único cromossomo circular de 4.791.961 pb com em média 52,05% de G+C, possui sete óperons rRNA com cinco cópias em um replicon e duas em outro (Deng *et al.*, 2003).

O genoma do CT18 possui um cromossomo com 4.809.037 pb com em média 52,09% de G+C, a cepa também possui os plasmídeos pHCM1 com 218.150 pb e pHCM2 com 106.516 pb. O pHCM1 é conjugativo e codifica resistência a todas as drogas de primeira linha usadas no tratamento da febre tifóide. O pHCM2 compartilha mais de 56% de sua sequência com o plasmídeo pMT1 associado a virulência da *Yersinia pestis* (Parkill *et al.*, 2001).

Ty2 possui relativamente poucas sequências de inserção (IS), com 26 cópias de IS200F e apenas três cópias (1 de cada) de outros elementos de inserção: IS1230B, IS285 e IS1351. Além desses elementos CT18 contém outros três elementos IS1. Genes relacionados a virulência *iroBCDEN* (codifica o sistema de armazenamento e absorção de ferro) e *sopE* (codifica a proteína efetora de secreção tipo III associada a invasão) estão localizados em profagos nos dois genomas. Talvez a diferença mais significativa entre Ty2 e CT18 esteja no seletivo silenciamento de genes funcionais em forma de pseudogenes. Em CT18 existem 204 pseudogenes, onde 9 destes são genes intactos em Ty2. Verificam-se 11 pseudogenes únicos em Ty2 e 195 são compartilhados com CT18 (Deng *et al.*, 2003).

A comparação dos cromossomos da *S. Typhi* CT18 e Ty2 demonstra um notável grau de conservação. Os isolados de *S. Typhi* são altamente relacionados, significando que muitas vezes é difícil diferenciar entre isolados de uma determinada área ou local e torna-se ainda mais difícil definir linhagens evolutivas dentro da população.



**Figura 2** - Mapa do genoma circular de Ty2. O genoma de Ty2 possui 4, 545 ORFs e 4, 516 pseudogenes que são compartilhados com CT18 (Primeiro círculo azul) e 29 que são únicos (na cor rosa). As pontas das setas dentro do segundo círculo mostram a localização e orientação dos óperons de r RNA (em vermelho) e tRNA (em turquesa). O terceiro círculo mostra a distribuição dos elementos de inserção: em azul, *IS200*; em vermelho, outros elementos de inserção. O Quarto círculo mostra a escala de pares de bases. O Quinto círculo mostra a relação C/G calculada para cada janela com 10 kb ao longo do genoma. O sexto e sétimo círculos mostram a comparação dos genomas de Ty2 e CT18: em azul (acima do eixo em CT18) indica regiões colineares, em vermelho (abaixo do eixo em CT18) indica regiões invertidas, verde indica regiões translocadas e invertidas dentro do genoma na região de inversão, e o amarelo indica regiões únicas (Fonte: Deng *et al.*, 2003).

## 1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA DA *Salmonella* Typhi

Genes que codificam as proteínas que compõe a estrutura de superfície bacteriana como LPS, flagelo e fímbria estão envolvidos com a virulência do patógeno e, além disso, estimulam a resposta imunológica do hospedeiro. Os determinantes específicos de virulência podem ser agrupados em ilhas de patogenicidade (SPI), esse agrupamento de genes frequentemente apresenta um conteúdo de CG diferente do *core* do genoma, e possuem sua origem frequentemente associada a plasmídeos ou fagos (Baker & Dougan, 2007).

Até o momento são conhecidas 15 SPI na *S. Typhi*, a SPI-1 contém genes envolvidos na invasão das células epiteliais, enquanto a SPI-2 contribui para a sobrevivência da *Salmonella* dentro dos macrófagos, ambas são encontradas em todos os sovars de *Salmonella* (Daigle, 2008). Uma característica importante dos isolados de *S. Typhi* é a cápsula polissacarídica Vi, a sua produção está relacionada com a ilha de patogenicidade SPI-7, o antígeno Vi protege o patógeno dos mecanismos de imunidade inata e mediada por anticorpos do hospedeiro, além de aumentar a resistência bacteriana à ação do sistema complemento, e da sua importância para sobrevivência do patógeno dentro dos fagócitos (Ferreira & Campos, 2008).

O LPS protege a bactéria da ação de defensinas, durante a infecção da mucosa intestinal, seria produzida uma pequena quantidade do lipopolissacarídeo para promover a invasão, enquanto que no sangue e nos tecidos seria produzida uma quantidade maior do antígeno para conferir resistência a ação bactericida do sistema complemento (Hoare *et al.*, 2006).

A adesão bacteriana às células do hospedeiro por meio de fímbrias é frequentemente considerado um fator importante para a colonização. O genoma da *S. Typhi* contém 13 óperons correspondentes a genes fimbriais, dos quais 5 (*sef*, *sta*, *ste*, *stg*, *tcf*) podem ser importantes para a especificidade do hospedeiro na infecção por *S. Typhi* (Daigle, 2008).

Eichelberg & Galán (2000) estudaram as mutações em genes flagelares e verificaram que ocorria diminuição da capacidade de entrada da *S. Typhi* em culturas de células e redução significativa da expressão dos componentes do

sistema de secreção do tipo III, demonstrando assim a importância destes genes na virulência da bactéria.

### 1.7 MÉTODOS PARA A ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA *Salmonella* Typhi

A diversidade genética em populações de *S. enterica* subespécie *enterica* vem sendo analisada por várias técnicas como MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) (Beltran *et al.*, 1988; Reeves *et al.*, 1989), MLST (Multilocus Sequence Typing) e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Torpdahl *et al.*, 2005; Soyer *et al.*, 2010).

Um método usado para realizar estudos genéticos em populações bacterianas é o MLST. Essa técnica é baseada na determinação de sequências de DNA, e, tem sido aplicada para muitos patógenos importantes fornecendo informações sobre a evolução e a diversificação de espécies, sendo útil para entender a evolução de clones e a patogenicidade da *Salmonella*. No entanto, possui desvantagens como a acessibilidade limitada e o custo elevado (Belkum *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2009).

O PFGE revela-se um método útil para distinguir isolados na vigilância e investigação de surtos, no mapeamento do genoma de diferentes espécies, e, além disso, mais de 20 anos desde o seu desenvolvimento destaca-se como uma técnica empregada para avaliar as relações epidemiológicas na maioria das bactérias clinicamente relevantes (Torpdahl *et al.*, 2005; Goering 2010).

Estudos da epidemiologia molecular de *S. Typhi* estão sendo realizados por meio da técnica de PFGE demonstrando significativa diversidade genética das cepas isoladas em surtos e casos esporádicos de febre tifóide (Thong *et al.*, 1994; Thong *et al.*, 1995; Moehario, 2009).

No estudo de Thong *et al.* (1994) realizado na Malásia, foi possível observar através da técnica de PFGE, usando-se três endonucleases de restrição (*XbaI*, *SpeI* e *AvrII*), que vários clones de *S. Typhi* são endêmicos, co-existindo simultaneamente, causando surtos e casos esporádicos de febre tifóide.

Em um estudo realizado na Malásia, Tailândia e Indonésia, países endêmicos para a febre tifóide; foi possível observar através da técnica de PFGE, uma considerável diversidade genética entre os isolados de casos esporádicos, sugerindo a mobilidade e circulação destas cepas (Thong *et al.*, 1995).

Outros métodos genotípicos usados para estudos com isolados de *S. Typhi* também são descritos como: RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), Ribotipagem (técnica baseada na hibridação DNA-DNA), e Micro arranjo de DNA (Nair *et al.*, 1999; Hirose *et al.*, 2003; Frye *et al.*, 2010).

### 1.8 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

O PFGE é um método empregado na análise de fragmentos de DNA genômico com alto peso molecular digeridos por endonucleases. Na técnica, as moléculas de DNA são submetidas a campos elétricos que mudam de direção de acordo com um padrão pré-determinado, o que permite que as moléculas sejam reorientadas antes de ocorrer a migração, levando a uma separação de acordo com o tamanho do fragmento da molécula, a corrida eletroforética acontece em uma base de gel de agarose (Magalhães *et al.*, 2005). A resolução desta técnica depende de alguns fatores como voltagem, concentração de agarose, temperatura, solução tamponante, tempo de pulso e de corrida eletroforética, bem como, da integridade do DNA.

A técnica possui poder discriminatório bastante elevado apresentando-se como um instrumento eficaz na avaliação da diversidade genética de *S. Typhi*, além de ser considerado como padrão ouro em epidemiologia molecular (Thong *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2005).

É possível, por meio do PFGE, determinar as relações genéticas entre cepas circulantes em diferentes locais, podendo-se aplicar a técnica em estudos que envolvem casos esporádicos ou surtos, bem como, na comparação de populações bacterianas envolvendo cepas de diferentes países. No trabalho de Salve *et al.* (2006), foi possível determinar as relações genéticas entre cepas circulantes no período compreendido entre 1988 e 2004 na Argentina e na Colômbia. Moehario (2009) investigou cepas de cinco áreas

geográficas diferentes na Indonésia, isoladas de pacientes com febre tifóide, identificando diferentes clones estando um clone presente em todas as regiões estudadas.

Um emprego importante da técnica foi demonstrado no estudo do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), onde em 1996 e 1997, foi realizada uma vigilância ativa para febre tifóide nos Estados Unidos. Os isolados foram obtidos de pessoas que viajaram para 31 países diferentes, encontrando-se através da técnica de PFGE, diversidade de clones no Sudoeste Asiático e subcontinente Indiano, e clones idênticos presentes em locais geograficamente distantes. Foi importante o emprego da genotipagem por PFGE, pois, sugeriu origem geográfica específica e ajudou a focalizar a investigação epidemiológica sobre alimentos importados e visitantes oriundos destes países (Kubota et al., 2005).

É importante ressaltar que os resultados da análise molecular devem ser discutidos em conjunto com dados epidemiológicos para determinar a ocorrência de um surto.

## 1.9 OBJETIVOS

### 1.9.1 **Objetivo Geral**

Caracterizar molecularmente amostras de *Salmonella* Typhi isoladas de casos clínicos entre o período de 1970 a 2009 no Estado do Pará e verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

### 1.9.2 **Objetivos Específicos**

- Verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *S. Typhi* isoladas de casos clínicos de febre tifóide;
- Identificar a presença do gene *viaB* que está envolvido no mecanismo de virulência da *S. Typhi*.
- Detectar a presença dos integrons de classe 1 e 2 que podem estar relacionados a resistência antimicrobiana.
- Analisar a variabilidade genética da *S. Typhi* em amostras isoladas de casos clínicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

Considerando variáveis de demografia, tempo e espaço foram selecionadas 151 amostras de *Salmonella* Typhi disponíveis na Bacterioteca da Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas (IEC). Todas as amostras foram provenientes de casos de febre tifóide com isolamento de *S. Typhi* a partir de 51 hemoculturas e 100 coproculturas no Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas do IEC, no período entre 1970 e 2009, sendo procedentes de 35 municípios do Estado do Pará: em Belém foram 52 amostras, 5 em Limoeiro do Ajuru, 1 em Curionópolis, 2 em Paragominas, 1 em Santarém, 4 em Curalinho, 11 em Abaetetuba, 5 em Breves, 12 em Ananindeua, 5 em Portel, 2 em Óbidos, 1 em Capanema, 6 em Anajás, 1 em Gurupa, 1 em Marabá, 1 em Tailândia, 3 em Bagre, 2 em Bujaru, 3 em Marituba, 7 em Igarapé-Miri, 2 em Barcarena, 3 em Acará, 3 em Moju, 1 em Oeiras do Pará, 2 em Castanhal, 1 em Chaves, 1 em Santarém Novo, 1 em Tracuateua, 2 em Ponta de Pedras, 1 em Irituia, 1 em Colares, 4 em Cametá, 2 em Muaná, 1 em São Sebastião da Boa Vista e 1 em Mocajuba (Figuras 3 e 4). Informações adicionais sobre as amostras deste estudo podem ser observadas no Apêndice 1.

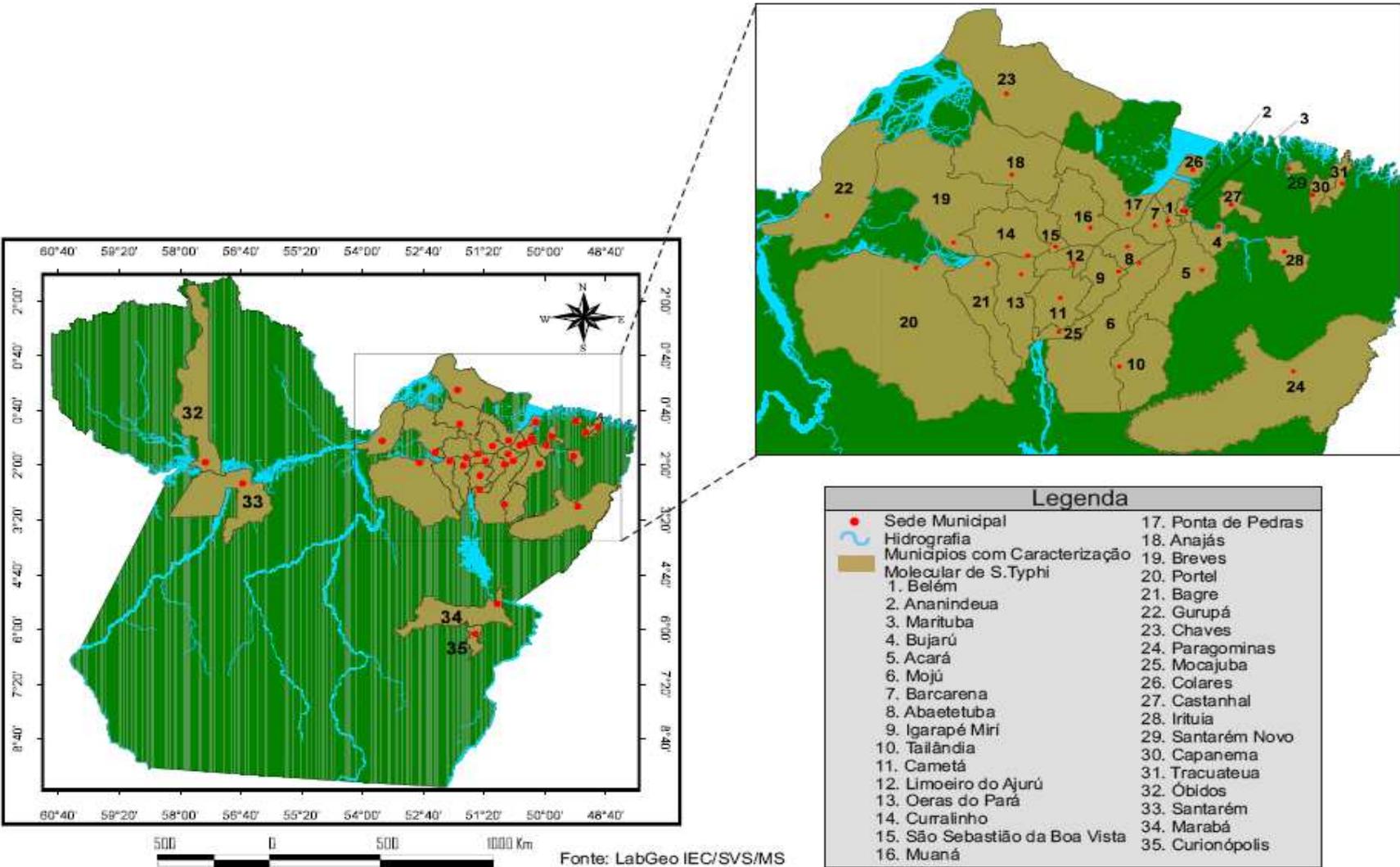
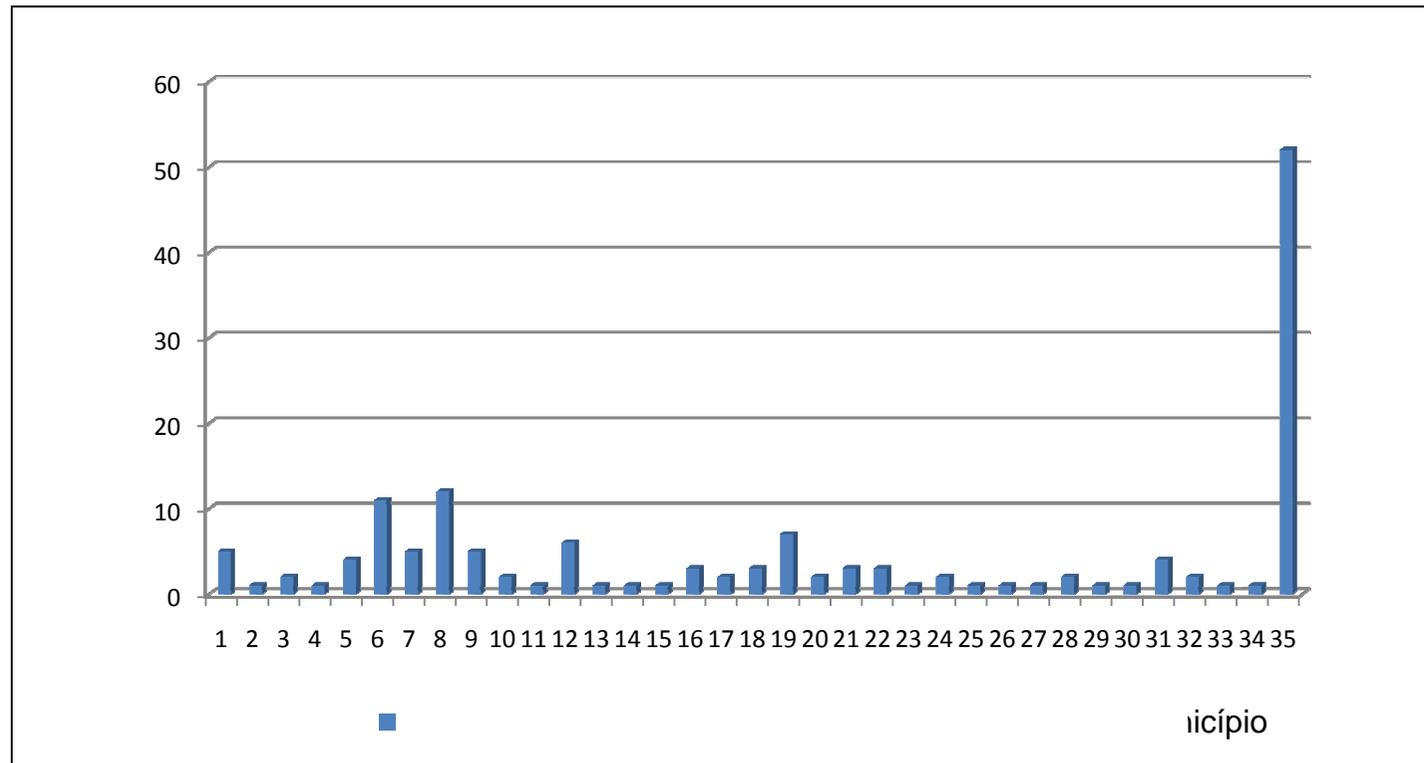


Figura 3 - Estado do Pará com destaque para os 35 municípios investigados neste estudo. Fonte: LabGeo IEC/SVS/MS.

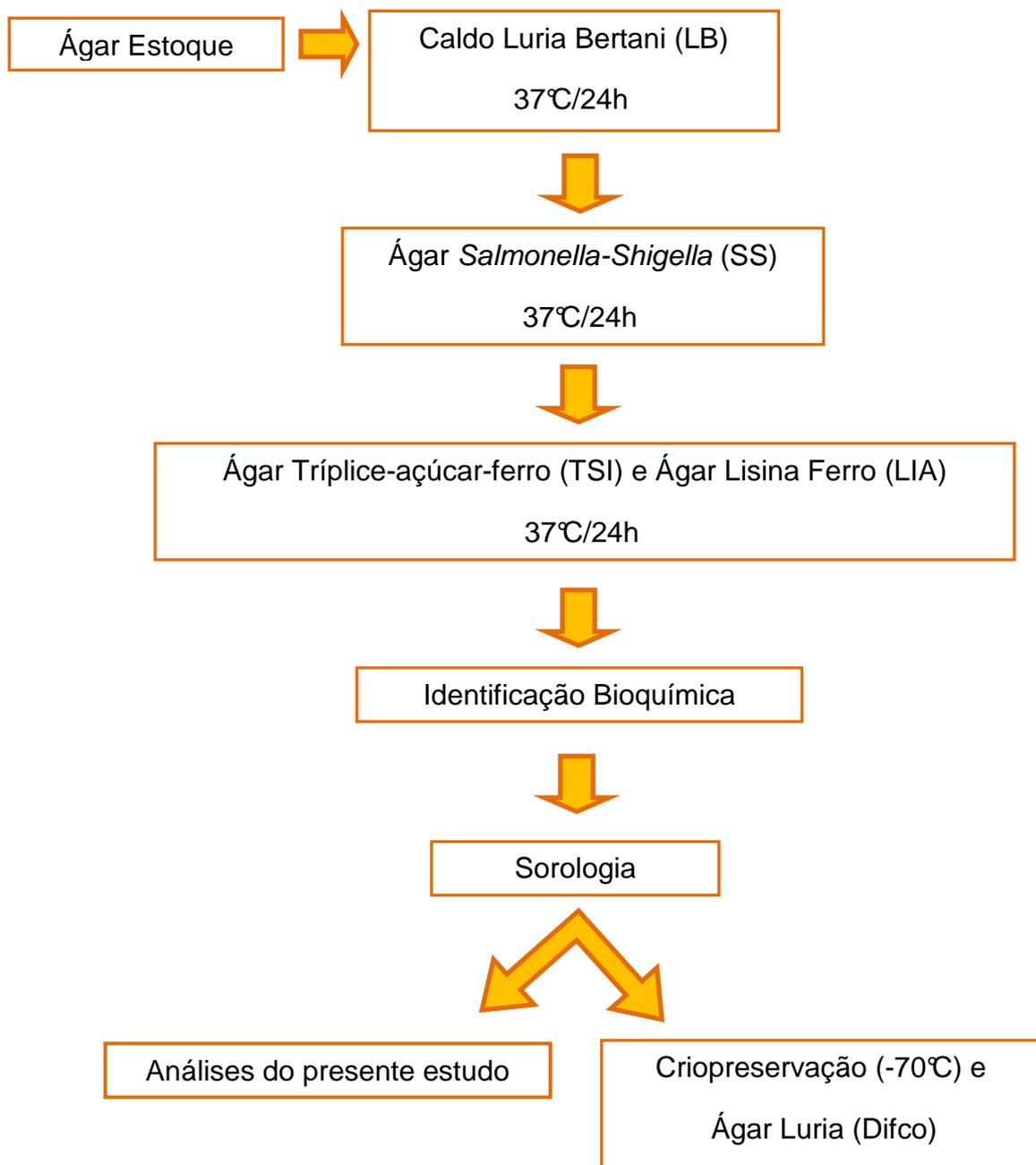


**Figura 4** - Distribuição espacial das 151 amostras de *Salmonella* Typhi isoladas a partir de 51 hemoculturas e 100 coproculturas no Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Evandro Chagas no período de 1970 a 2009 em 35 municípios do Estado do Pará. Coluna 1: Limoeiro do Ajuru, coluna 2: Curionópolis, coluna 3: Paragominas, coluna 4: Santarém, coluna 5: Currealinho, coluna 6: Abaetetuba, coluna 7: Breves, coluna 8: Ananindeua, coluna 9: Portel, coluna 10: Óbidos, coluna 11: Capanema, coluna 12: Anajás, coluna 13: Gurupa, coluna 14: Marabá, coluna 15: Tailândia, coluna 16: Bagre, coluna 17: Bujaru, coluna 18: Marituba, coluna 19: Igarapé-Miri, coluna 20: Barcarena, coluna 21: Acará, coluna 22: Moju, coluna 23: Oeiras do Pará, coluna 24: Castanhal, coluna 25: Chaves, coluna 26: Santarém Novo, coluna 27: Tracuateua, coluna 28: Ponta de Pedras, coluna 29: Irituia, coluna 30: Colares, coluna 31: Cametá, coluna 32: Muaná, coluna 33: São Sebastião da Boa Vista, coluna 34: Mocajuba, coluna 35: Belém.

## 2.2 REIDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de *Salmonella* Typhi armazenadas em ágar estoque (Difco, U.S.A) foram repicadas para o caldo Luria Bertani (LB) (Difco, U.S.A) e incubadas em estufa na temperatura de 37 °C durante 24 horas. Após a turvação do caldo uma alíquota foi semeada em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Difco, U.S.A) e incubada a 37 °C por 24 horas. De cada placa foram selecionadas duas colônias lactose negativas e semeadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (Difco, U.S.A) e ágar lisina ferro (LIA) (Difco, U.S.A), e incubadas a 37 °C por 24 horas. As amostras que apresentaram reações bioquímicas características nos meios de triagem (Alcalino/Ácida, sem gás, e com pouco H<sub>2</sub>S, e reação positiva para lisina descarboxilase) foram identificadas bioquimicamente segundo as recomendações de Ewing (1986). Após a caracterização bioquímica realizou-se a identificação sorológica por meio da determinação dos antígenos somáticos (OD1), flagelares (Hd) e do envoltório (Vi) para a confirmação do sorovar *Salmonella* Typhi.

As culturas puras de *S. Typhi* confirmadas foram usadas para as análises propostas no presente estudo, além de serem armazenadas em tubos de criopreservação de 2 mL contendo caldo Luria Bertani (LB) acrescido com glicerol a 20% e congelados em *freezer* a temperatura de - 70 °C, bem como, em tubos 12x75mm contendo ágar Luria (Difco, U.S.A) arrolhados com rolhas de borracha e parafinados, e mantidos na Bacterioteca do Instituto Evandro Chagas (Figura 5).



**Figura 5** – Fluxograma da reidentificação e manutenção das amostras de *Salmonella Typhi* isoladas no Estado do Pará no período de 1970 a 2009.

### 2.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foram realizados testes para a análise da suscetibilidade da *S. Typhi* aos onze antimicrobianos recomendados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da febre tifóide. As amostras de *S. Typhi* foram avaliadas pelo sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, França), onde foram empregados oito antimicrobianos contidos na cartela de exame; foi também realizado o teste de disco-difusão, onde foram avaliados três antimicrobianos que não estavam contidos na cartela do sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, França). Os métodos estão de acordo com as normas preconizadas pela décima nona edição do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* de 2009 que se baseia no método descrito originalmente por Bauer *et al.* (1966).

No método de disco-difusão cada amostra previamente armazenada em ágar Luria foi semeada em caldo Müeller-Hinton (5 mL) e incubada a 35°C por 6 horas. A turbidez do inóculo foi avaliada usando um turbidímetro comparável ao padrão da escala de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A semeadura foi realizada usando um *swab* estéril embebido da suspensão bacteriana que foi passado em toda a superfície do Ágar obtendo-se uma distribuição uniforme do inóculo. A tampa da placa foi deixada entreaberta por três a cinco minutos antes da aplicação dos discos impregnados com a droga. Os discos foram pressionados de encontro ao Ágar e as placas foram invertidas e colocadas em estufa a 35°C. Após 16-18 horas de incubação, realizou-se a leitura usando um paquímetro. Os tamanhos dos halos de inibição classificaram os organismos como sensíveis, intermediários ou resistentes as drogas testadas de acordo com recomendações do CLSI (2009). Os antimicrobianos testados pelo método são descritos na Quadro 5.

Quadro 5 - Agentes antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão e interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana.

Agente Antimicrobiano	Abreviação	Concentração	R	I	S
Cloranfenicol	C	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Cefotaxima	CTX	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Gentamicina	GM	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15

Controle de qualidade recomendado pelo CLSI (2009): ATCC: *Escherichia coli* 25922. Resistente (R), Intermediário (I) e Sensível (S).

No sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 Systems (BioMérieux, França), foi usado o cartão Vitek<sup>®</sup> 2 Systems (AST-GN05 / REF 22001). A carta do sistema do teste de sensibilidade é um método automatizado baseado na técnica da Concentração Mínima Inibitória (CMI). A suspensão bacteriana foi diluída em solução salina 0,45%. No módulo de preenchimento do aparelho, a suspensão foi transferida para o cartão, que em seguida foi cheio, selado e colocado no módulo de incubadora e leitura do aparelho. O aparelho monitora o crescimento em cada um dos poços durante 18 horas, no final do ciclo de incubação, os valores da CMI são determinados para cada antibiótico especificado na carta. Os agentes antimicrobianos testados através do método automatizado são descritos na Quadro 6.

Quadro 6 - Agentes antimicrobianos testados pelo sistema automatizado Vitek 2 e interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana.

Agente Antimicrobiano	Abreviação	Concentração	Resistente	Sensível
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	AMC	4/2 µg/mL, 16/8 µg/mL; 32/16 µg/mL	≤ 2/1	≥ 32/16
Ampicilina	AM	4 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL	≤ 2	≥ 32
Ceftazidima	CAZ	1 µg/mL, 2 µg/mL 8 µg/mL, 32 µg/mL	≤ 1	≥ 64
Ciprofloxacina	CIP	0,5 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL	≤ 0,25	≥ 4
Ácido Nalidíxico	NA	8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL	≤ 2	≥ 32
Nitrofurontoina	NIT	16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL	≤ 16	≥ 512
Tetraciclina	TE	2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL	≤ 1	≥ 16
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	SXT	0,5/9,5 µg/mL, 2/38 µg/mL, 16/304 µg/mL	≤ 20 (1/19)	≥ 320 (16/304)

## 2.4 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)

Para a detecção do gene *viaB* e dos integrons de classe 1 e 2 foi empregada a técnica da Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR). A presença dos integrons foi analisada através da amplificação de fragmentos dos genes da integrase *Int1* e *Int2*. O DNA total das cepas foi extraído pela técnica de fervura e congelamento (Baloda, *et al.* 1995). Os fragmentos dos genes *ViaB*, *int1* e *int2* foram amplificados por PCR pelos iniciadores vi, Int1 e Int2, respectivamente. As sequências usadas são descritas na Quadro 7.

Quadro 7 – Descrição dos genes e iniciadores empregados na reação de PCR

Gene	Iniciador	Seqüência do Nucleotídeo (5´ - 3´)	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
<i>viaB</i>	vi-for	GTTATTCAGCATAAGGAG	439	Levy <i>et al.</i> , 2008.
	vi-rev	CTTCCATACCACTTTCCG		
Gene da integrase de classe I	Int1-for	AAAACCGCCACTGCGCCGTTA	1068	Fonseca <i>et al.</i> , 2005.
	Int1- rev	GAAGACGGCTGCACTGAACG		
Gene da integrase de classe II	Int2-for	GCGTTTTATGTCTAACAGTCC	972	Sá <i>et al.</i> , 2010.
	Int2-rev	AAGTAGCATCAGTCCATCC		

As reações de amplificação foram preparadas com volume final de 25 µL, sendo constituídas por tampão de reação 1X (15mM MgSO<sub>4</sub>; 100 mM KCl; 80mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 100mM Tris-HCl [pH 9.0]; 0,5% NP-40; 1,5mM MgCl<sub>2</sub> – NeoBio, B.R); 5,0 mM de dNTP (Invitrogen, U.S.A); 2,5 pmol/µL de cada

oligonucleotídeo (Bioneer, U.S.A); 1,0 U de taq DNA polimerase (NeoBio B.R) e 1  $\mu$ L de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, EUA), com as condições de termociclagem descritas no Quadro 8.

Para visualização do produto final da PCR, todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio ( $1.0 \times 10^{-4}$  mg/mL), no qual foram aplicados 8  $\mu$ L da PCR, misturado a 2  $\mu$ L de corante DYE 6X. Os fragmentos foram observados em transluminador de ultravioleta para posterior registro em sistema de detecção BioImaging Systems (UPV, E.U.A), os tamanhos dos fragmentos amplificados foram mensurados pelo tamanho do produto amplificado, juntamente com os controles positivos (S57/ Instituto Pasteur, V492/ Instituto Evandro Chagas/Belém, L34/ Fiocruz-RJ, e o marcador de peso molecular (1 kb).

Quadro 8 - Condições de amplificação na Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) para os primers Int1, Int2 e vi.

<i>Primer</i>	Etapas da PCR	Temperatura	Tempo	Nº Ciclos
Int1	Desnaturação inicial	94°C	5 min.	1
	Desnaturação	94°C	1 min.	35
	Hibridização	65 °C	50 seg.	
	Extensão	72 °C	50 seg.	
	Extensão final	72 °C	7 min.	1
Int2	Desnaturação inicial	94°C	5 min.	1
	Desnaturação	94°C	1 min.	35
	Hibridização	55 °C	1 min.	
	Extensão	72 °C	1 min.	
	Extensão final	72 °C	7 min.	1
vi	Desnaturação inicial	95°C	2 min.	1
	Desnaturação	95°C	1 min.	35
	Hibridização	55 °C	1 min.	
	Extensão	72 °C	1 min.	
	Extensão final	72 °C	7 min.	1

## 2.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Para a análise do DNA genômico das amostras de *S. Typhi* foi usada a técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) segundo protocolo padronizado para *Salmonella* (Ribot *et al.*, 2006), com algumas modificações, usando-se a endonuclease de restrição *XbaI*. Foi usada também a cepa padrão universal *Salmonella* Braenderup H9812 (Hunter *et al.*, 2005). As etapas para a realização da PFGE são descritas a seguir:

### 2.5.1 Semeadura das amostras

As amostras de *S. Typhi* foram semeadas em caldo triptona de soja (TSB) (Difco, U.S.A) e incubadas a 37°C por 6h, após turvação do meio de cultura realizou-se o semeio em placas contendo ágar triptona de soja (TSA) (Difco, U.S.A) para obtenção de colônias isoladas incubando-se a 37°C por 14 a 18h, após selecionou-se uma colônia e novamente semeou-se em TSA para obtenção de crescimento confluyente (a partir de uma única colônia) incubando-se a 37°C por 14 a 18h.

### 2.5.2 Preparação dos *Plugs* de PFGE

Foram distribuídos 3 mL da solução de suspensão celular (Tris 1M [pH:8,0]; EDTA 0,5 M [pH:8,0]) em tubos de 12x75mm para o preparo da suspensão bacteriana, com a turvação compatível com a escala 1,0 de McFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL).

Foram transferidos para um *Eppendorf* 300 µL do inóculo, 15 µL de proteinase K (0,020g/mL) e 300 µL (0,3mL) de agarose Seakem Gold 1,0% (Tris 1M [pH:8,0] e SDS 20%) fundida. Em seguida, a mistura foi distribuída na cavidade de um molde para *plugs*. Os *plugs* solidificam a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos.

Foram distribuídos 5 mL da solução de lise celular (Tris 1M [pH:8,0], EDTA 0,5M [pH 8.0], Sarcosyl 10% e Proteinase K), previamente preparada, em tubos cônicos de 50mL. Os *plugs* foram retirados do molde e transferidos para os tubos contendo a solução de lise celular, com incubação a 54°C por 2h, sob leve agitação.

Os tubos foram retirados da estufa e a solução de lise foi descartada. Foram realizadas duas lavagens adicionando-se 15 mL de água destilada pré-aquecida a 50°C, com incubação em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Outras quatro lavagens foram realizadas adicionando-se 15 mL de tampão TE (Tris 1M [pH:8,0] e EDTA 0,5 M [pH:8,0]) pré-aquecido a 50°C, com incubação em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Os *plugs* foram armazenados com 20 mL de TE, sob refrigeração a 4°C.

### 2.5.3 Digestão de DNA com Enzimas de Restrição

Foi cortado um *plug* de aproximadamente 2 mm de largura e transferido a um *Eppendorf* contendo 200 µL da solução de pré-digestão, composta por *Buffer* 1X (50 mM Tris-HCl [pH:8,0]; 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM NaCl) e Água Milli-Q, incubando-se a 37°C por 10 minutos.

Após a incubação a solução de pré-digestão foi retirada com uma micropipeta, em seguida, foi preparada a solução de digestão contendo *Buffer* 1X (50 mM Tris-HCl [pH:8,0]; 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM NaCl), enzima de restrição *Xba*I (50 U - invitrogen) e Água Milli-Q, com posterior incubação de 18 a 24h a 37°C. Os procedimentos também foram realizados para a cepa controle *Salmonella* Braenderup H9812. (Hunter *et al.*, 2005). No Quadro 9 é descrita a enzima de restrição usada neste estudo.

Quadro 9 - Enzima de restrição usada para digestão de DNA genômico da *S. Typhi* pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Enzima de Restrição	Sequência de DNA alvo	Quantidade de fragmentos
<i>Xba</i> I	5' – TCTAG_A – 3'	35

### 2.5.4 Aplicação das Amostras no Gel de Agarose

A solução de digestão encontrada no *Eppendorf* foi retirada e os *plugs* foram colocados na extremidade do pente, com posterior fixação no molde, após a secagem, o gel de agarose Seakem Gold (SKG) a 1% em TBE 0.5X foi despejado deixando-se solidificar por aproximadamente 30 minutos, usou-se também o marcador de alto peso molecular *ladder* (BIOLABS New England

Biolabs, MA, USA). Posteriormente, o gel foi colocado na cuba para a corrida eletroforética.

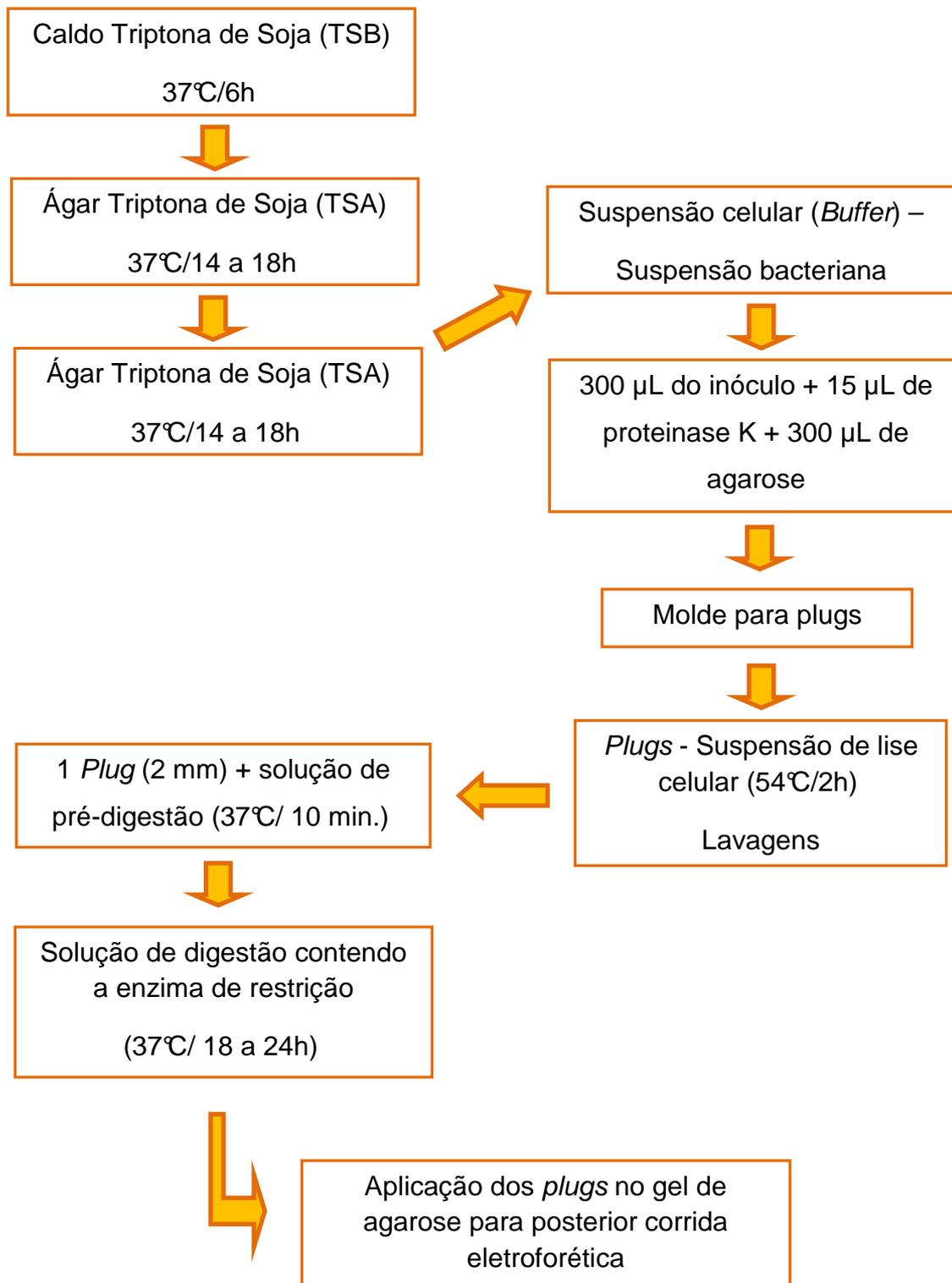
### 2.5.5 Condições para a Corrida Eletroforética

O gel foi submerso em 1900 mL de tampão TBE 0.5X contido na cuba eletroforética. Os fragmentos de DNA genômico foram separados por eletroforese usando-se o equipamento CHEF-DR<sup>®</sup>III (Bio-Rad, Hercules, CA) com refrigeração do TBE a 14 °C.

A corrida eletroforética foi de 24 horas; com gradiente de voltagem de 6 V/cm; tempo de pulso inicial de 5 s; tempo de pulso final de 30 s e ângulo de inclinação de 120°. Após o término da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) por 1 hora, com posterior lavagem em H<sub>2</sub>O Milli-Q. O padrão de bandas foi observado sob luz ultravioleta (UV) e fotografado no formato TIFF usando-se o sistema de foto-documentação modelo Photo-Print IP-010.SD, versão10 (VILBER LOURMAT). A figura 6 mostra um fluxograma da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

### 2.5.6 Interpretação e Análise de Dados

Foi realizada análise visual das fotografias e análise através do *software* BioNumerics v. 5.1 (Applied Maths/Bélgica). As fotos foram normalizadas com nove marcadores (de 48.5 a 436.5 Kb), analisando-se todos os fragmentos obtidos. Os percentuais de similaridade do dendograma foram estimados pelo Coeficiente de Dice, onde foram calculados com 2,5% de tolerância usando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). Para a determinação dos *clusters*, foi adotado o percentual de similaridade 80% de acordo com descrito por Kim *et al.* (2009), levando-se também em consideração o agrupamento realizado pelo *software* (*Cluster cutoff values*). Os perfis de PFGE obtidos no presente estudo foram denominados de pulsotipos; os perfis considerados geneticamente idênticos foram aqueles que apresentaram percentual de similaridade de 100%, e aqueles com uma ou mais bandas de diferença, foram considerados diferentes.



**Figura 6** – Fluxograma da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para a análise do DNA genômico da *S. Typhi*.

## 2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

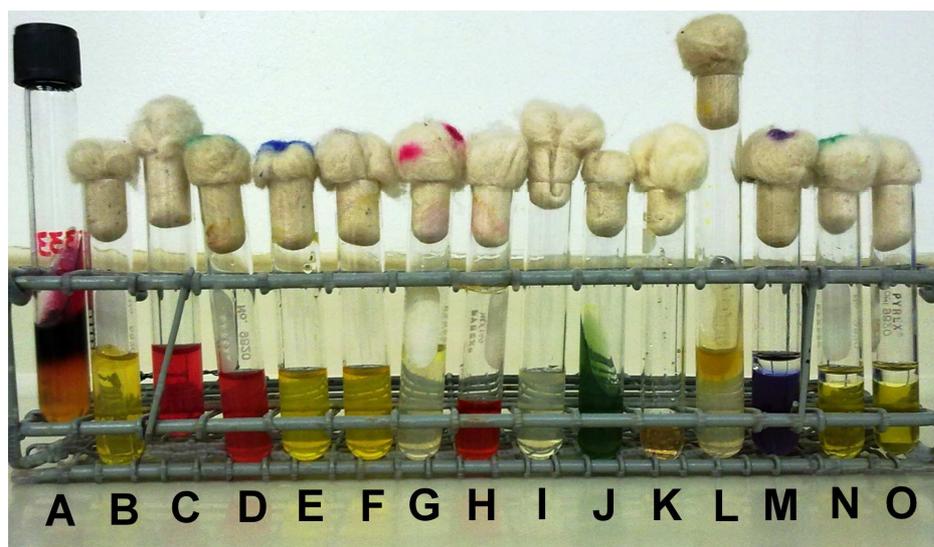
O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (IEC) e teve resolução favorável, obtendo o número de protocolo nº 011/10 e parecer de aprovação nº 0023/2010.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA E SOROLÓGICA DA *Salmonella* Typhi

Todos os 151 isolados foram submetidos à recuperação e apresentaram características bioquímicas inerentes da *Salmonella* Typhi (Figura 7).

Foi realizada identificação sorológica em todas as amostras. Houve soro-aglutinação dos antígenos somático (OD1) e flagelar (Hd) em todos os 151 isolados, no entanto o antígeno do envoltório (Vi) apresentou soro-aglutinação em 147 (97,35%) amostras. Os 4 (2,65%) isolados que foram negativos para o Vi, pertencem aos anos de 1979, 1982, 1985 e 1986.



**Figura 7** - Série bioquímica usada no presente estudo para identificação da *Salmonella* Typhi. A – *S. Typhi* isolada em ágar TSI, B – Glicose (+), C – Lactose ( - ), D – Sacarose ( - ), E – Manitol ( + ), F – Maltose ( + ), G – Indol ( - ), H – Vermelho de Metila ( + ), I – Motilidade ( + ), J – Citrato ( - ), K – Uréia ( - ), L – Fenilalanina ( - ), M – Lisina Descarboxilase ( + ), N- Ornitina descarboxilase ( - ), O - Controle negativo dos aminoácidos. Fonte: Acervo IEC.

### 3.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DA *Salmonella* Typhi AOS ANTIMICROBIANOS

No presente estudo o resultado do teste de suscetibilidade indicou que todos os isolados de *S. Typhi* foram sensíveis à Gentamicina, Cloranfenicol, Cefotaxima, Amoxicilina - Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ceftazidina, Ciprofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tetraciclina e Sulfametoxazol – Trimetoprim. Foi observado perfil de resistência à nitrofurantoína em 3 (1,99%) isolados, e 10 (6,62%) apresentaram o perfil de resistência intermediária ao mesmo antimicrobiano (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa da suscetibilidade aos antimicrobianos de 151 *S. Typhi* isoladas no Estado do Pará.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Sensível</b>		<b>Intermediário</b>		<b>Resistente</b>	
	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Gentamicina (GM)	151	100	0	0	0	0
Cloranfenicol (C)	151	100	0	0	0	0
Cefotaxima (CTX)	151	100	0	0	0	0
Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC)	151	100	0	0	0	0
Ampicilina (AM)	151	100	0	0	0	0
Ceftazidina (CAZ)	151	100	0	0	0	0
Ciprofloxacina (CIP)	151	100	0	0	0	0
Ácido Nalidíxico (NA)	151	100	0	0	0	0
Nitrofurantoína (NIT)	138	91,39	10	6,62	3	1,99
Tetraciclina (TE)	151	100	0	0	0	0
Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)	151	100	0	0	0	0

Nº: número absoluto; ( ): abreviações dos antimicrobianos

Dentre as três amostras de *S. Typhi* resistentes pôde-se observar somente um padrão de monorresistência à nitrofurontoína, destacando-se os anos de 1975, 1995 e 2002 (Quadro 10).

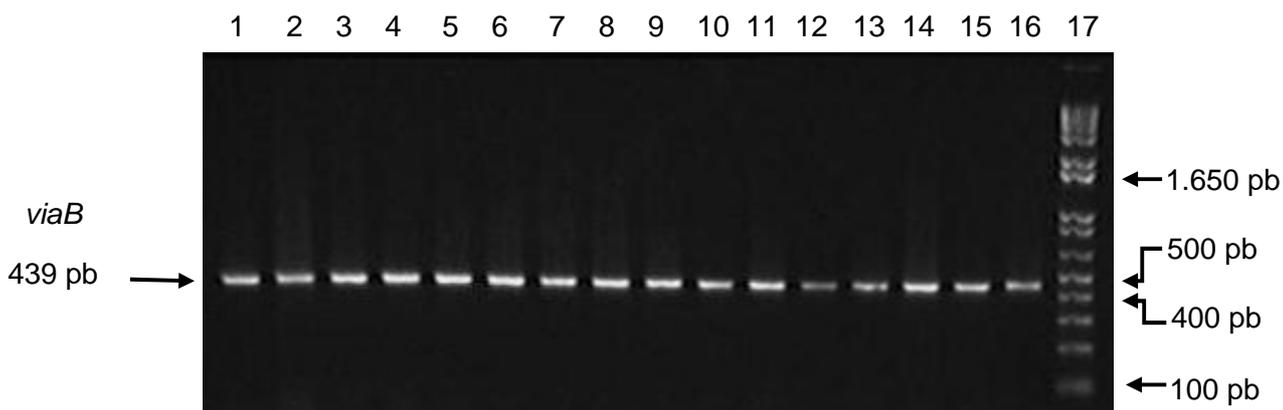
Quadro 10 - Período, procedência e perfil de resistência a Nitrofurontoína de 151 *S. Typhi* isoladas no Estado do Pará.

Registro SABAC	Ano	Procedência	Perfil
IEC 29.716	1975	Paragominas	Intermediário
IEC 60	1975	Belém	Resistente
IEC 3171	1995	Belém	Resistente
IEC 9366	1997	Belém	Intermediário
IEC 4172	1998	Ananindeua	Intermediário
IEC 281	1998	Belém	Intermediário
IEC 2186	2002	Igarapé Miri	Resistente
IEC 2432	2005	Muaná	Intermediário
IEC 8254	2006	Abaetetuba	Intermediário
IEC 2796	2006	Breves	Intermediário
IEC 1535	2007	Cametá	Intermediário
IEC 6984	2007	Igarapé Miri	Intermediário
IEC 2756	2008	Portel	Intermediário

SABAC: Seção de Bacteriologia e Micologia/IEC.

### 3.3 DETECÇÃO DO GENE *viaB* ENVOLVIDO NO MECANISMO DE VIRULÊNCIA DA *Salmonella* Typhi

O gene *viaB* foi pesquisado em todas as 151 amostras do presente estudo. O produto de amplificação de 439 pb foi visualizado em 147 (97,35%) amostras analisadas, somente 4 (2,65%) isolados dos anos de 1979, 1982, 1985 e 1986 apresentaram-se negativos, o que está de acordo com o resultado obtido na soroglutinação do antígeno Vi. O produto de amplificação do gene *viaB* pode ser visualizado na Figura 8.



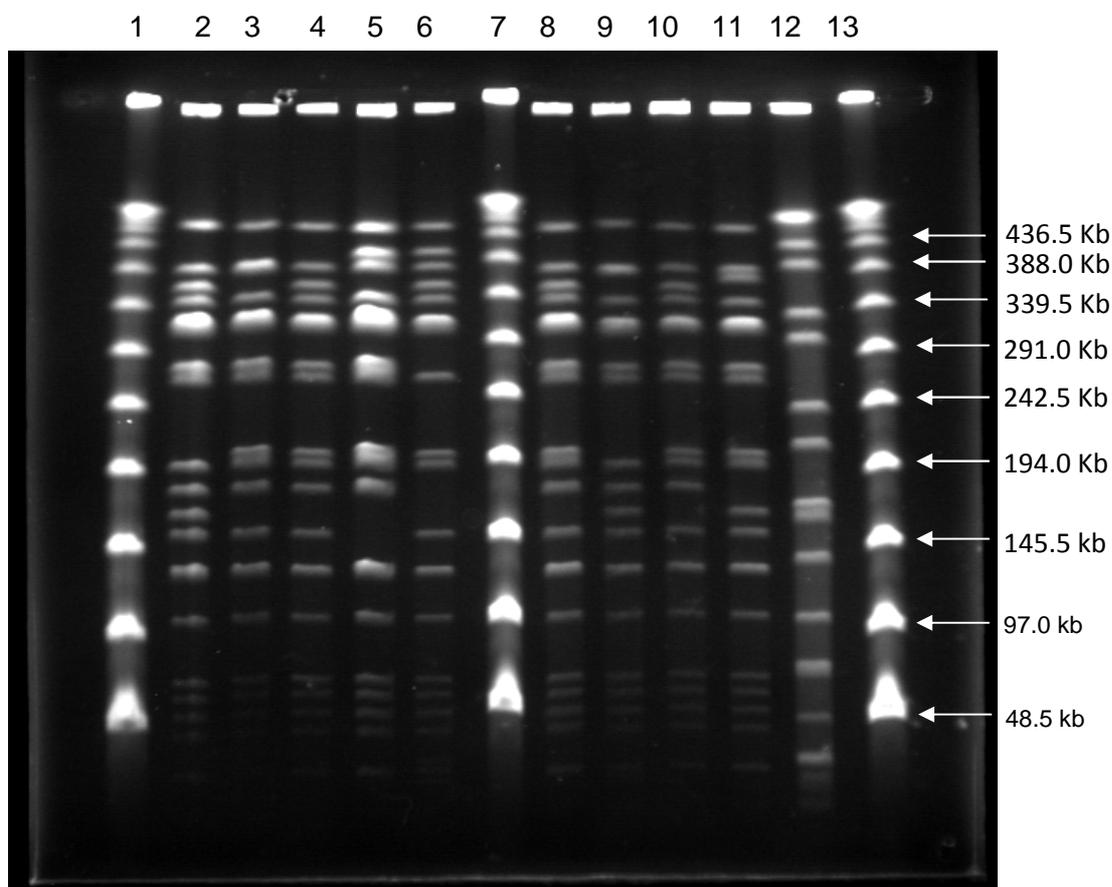
**Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização do produto de amplificação usando o iniciador vi. Coluna 1 a 15: amostras de *S. Typhi*; coluna 16: controle positivo e coluna 17: *Ladder* 1Kb. Fonte: Acervo IEC.

### 3.4 DETECÇÃO DOS INTEGRONS DE CLASSE 1 E 2 RELACIONADOS A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Para a detecção dos integrons de classe 1 e 2 foram pesquisados os genes da integrase *Int1* e *Int2*, que são parte do cassete gênico que constitui este elemento, o produto de amplificação é de 1068 e 972 pb, respectivamente. Não foi possível observar a presença dos integrons associados à resistência em todas as 151 (100%) amostras estudadas.

### 3.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

O perfil de macro-restrição do DNA genômico da *S. Typhi* foi definido por meio da técnica de PFGE usando-se a enzima *XbaI*, que possibilitou a obtenção de 14 a 18 fragmentos de DNA genômico, apresentando, desta forma, de 1 a 4 fragmentos de diferença, entre algumas amostras (Figura 9). As imagens dos géis foram analisadas no *software* Bionumerics v. 5.1, onde foi construído um dendograma que demonstrou a presença de 68 pulsotipos diferentes em um total de 151 amostras analisadas, obtendo-se um percentual médio de similaridade de 71,7%.



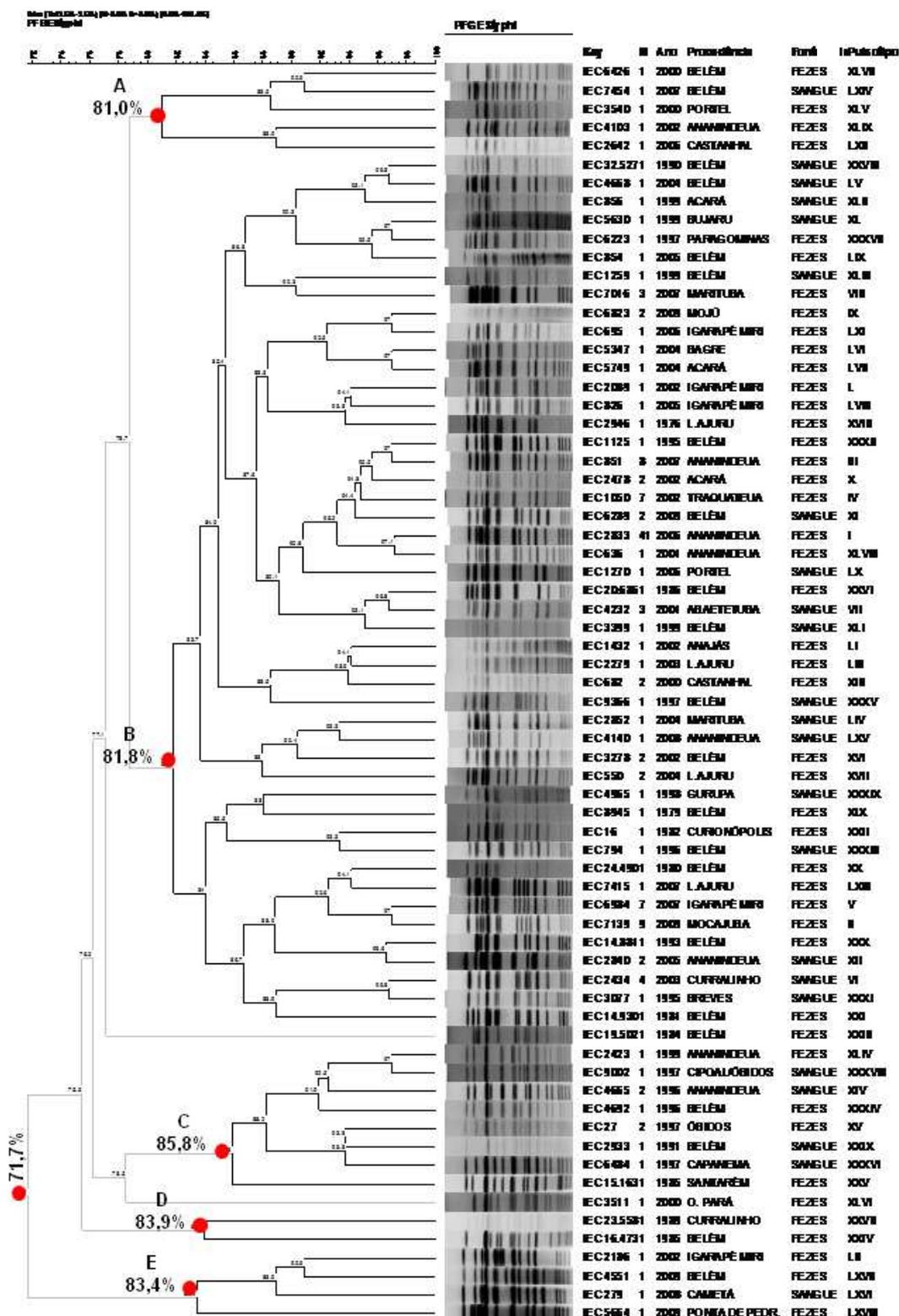
**Figura 9** - Perfil de macro-restrição do genoma de *S. Typhi* através da técnica Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). Colunas 1, 7 e 13: *Ladder* Lambda. Coluna 12: *S. Braenderup*. Colunas 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 11: Amostras de *S. Typhi*. Fonte: Acervo IEC.

O critério para definição dos grupamentos genômicos (*clusters*) formados, foi o percentual de similaridade de 80%. Em 151 amostras pôde-se observar 68 diferentes pulsotipos, destes, 66 estavam em 5 grupamentos genômicos, e 2 apresentam-se mais distantes destes 5 *clusters*. No total 100 amostras foram agrupadas em 17 pulsotipos diferentes e 51 apresentaram perfil único. Os pulsotipos estão destacados no dendograma através de algarismos romanos e os clusters através das letras A, B, C, D e E (figura 10). Os pulsotipos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI e XVII apresentaram duas ou mais amostras com 100% de similaridade.

No *cluster A* encontram-se 5 pulsotipos (XLVII, LXIV, XLV, XLIX e LXII) de 5 diferentes amostras, com um percentual de similaridade de 81,0%. Todas as amostras foram isoladas em diferentes anos (1999, 2007, 2000, 2002 e 2006) e em diferentes localidades do Estado do Pará (Acará, Belém, Portel, Ananindeua e Castanhal). Informações adicionais encontram-se no Quadro 11.

Quadro 11 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster A*

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurontoína	<i>viaB</i>
6426	XLVII	2000	Belém	Fezes	Sensível	(+)
7454	LXIV	2007	Belém	Sangue	Sensível	(+)
3540	XLV	2000	Portel	Fezes	Sensível	(+)
4103	XLIX	2002	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
2642	LXII	2006	Castanhal	Fezes	Sensível	(+)



**Figura 10** - Dendrograma mostrando o grupamento pelo método UPGMA e os perfis de macrorestrição (enzima *XbaI*) definidos por PFGE de 151 amostras de *S. Typhi*. Os pontos em vermelho destacam o percentual de similaridade e as letras A, B, C, D e E destacam os *clusters*. Key: registro IEC, N: nº de amostras em cada pulsótipo.

A maioria das amostras foi agrupada no *cluster* B com um percentual de similaridade de 81,8%. Neste grupo encontram-se 45 pulsotipos e 128 amostras, no qual, 96 amostras estão agrupadas em 15 pulsotipos diferentes e 32 apresentaram perfil único (Quadro 12). Em pulsotipos idênticos foi possível observar uma variação de tempo e espaço que abrangeu amostras desde 1975 até o ano de 2009. Nos pulsotipos VIII e XII os clones foram encontrados somente na região metropolitana de Belém nos anos de 1989, 1995, 1997, 2005 e 2007. No pulsotipo IV clones com 100% de similaridade foram encontrados em municípios (Tracuateua, Belém, Moju, Portel e Paragominas) que são regiões geográficas distantes uma da outra.

Não foi possível detectar o gene *viaB* nas amostras IEC 20.686 (pulsotipo XXVI), IEC 16.106 (pulsotipo VII) e IEC 8945 (pulsotipo XIX). As amostras IEC 3171 (pulsotipo III) e IEC 60 (pulsotipo II) apresentaram resistência à nitrofurantoína. Pôde-se observar perfil de resistência intermediária à nitrofurantoína nas amostras IEC 2432 (pulsotipo III), IEC 29.716 (pulsotipo IV), IEC 2756 (pulsotipo I), IEC 4172 (pulsotipo I), IEC 2796 (pulsotipo I), IEC 9366 (pulsotipo XXXV), IEC 6984 (pulsotipo V), IEC 281 (pulsotipo V), IEC 8254 (pulsotipo V) e IEC 1535 (pulsotipo II).

Quadro 12 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster B*

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurantoína	<i>viaB</i>
32.527	XXVIII	1990	Belém	Sangue	Sensível	(+)
4668	LV	2004	Belém	Sangue	Sensível	(+)
856	XLII	1999	Acará	Sangue	Sensível	(+)
5630	XL	1999	Bujaru	Sangue	Sensível	(+)
6223	XXXVII	1997	Paragominas	Fezes	Sensível	(+)
854	LIX	2005	Belém	Fezes	Sensível	(+)
1259	XLIII	1999	Belém	Sangue	Sensível	(+)
7016		2007	Marituba	Fezes	Sensível	(+)
24.909	VIII	1989	Belém	Sangue	Sensível	(+)
3598		1995	Ananindeua	Sangue	Sensível	(+)
6823	IX	2009	Mojú	Fezes	Sensível	(+)
5935		2004	Irituia	Sangue	Sensível	(+)
695	LXI	2006	Igarapé Miri	Fezes	Sensível	(+)
5347	LVI	2004	Bagre	Fezes	Sensível	(+)
5749	LVII	2004	Acará	Fezes	Sensível	(+)
2089	L	2002	Igarapé Miri	Fezes	Sensível	(+)
826	LVIII	2005	Igarapé Miri	Fezes	Sensível	(+)
2946	XVIII	1976	L. Ajurú	Fezes	Sensível	(+)
1125	XXXII	1995	Belém	Fezes	Sensível	(+)
851		2007	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
2532		2001	Anajás	Sangue	Sensível	(+)
3040		2002	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
3171	III	1995	Belém	Sangue	Resistente	(+)
3963		1999	Mojú	Fezes	Sensível	(+)
7621		2007	Bujaru	Fezes	Sensível	(+)
8274		1989	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
2432		2005	Muaná	Fezes	Intermediário	(+)
2478	X	2002	Acará	Fezes	Sensível	(+)
2665		1994	Belém	Fezes	Sensível	(+)
1050		2002	Tracuateua	Fezes	Sensível	(+)
2594		2003	Belém	Sangue	Sensível	(+)
2668 (16)		1999	Mojú	Fezes	Sensível	(+)
6824	IV	2002	Belém	Sangue	Sensível	(+)
7740		2009	Portel	Fezes	Sensível	(+)
9710		1988	Belém	Fezes	Sensível	(+)
29716		1975	Paragominas	Sangue	Intermediário	(+)
6289	XI	2009	Belém	Sangue	Sensível	(+)
4673		2004	Igarapé Miri	Fezes	Sensível	(+)

(Continuação)

Quadro 12 - Características das S.Typhi pertencentes ao *Cluster B*

2833		2006	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
3047		1999	Bagre	Fezes	Sensível	(+)
3154		1999	Barcarena	Fezes	Sensível	(+)
4315		1998	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
4593		1998	Marabá	Fezes	Sensível	(+)
644		2001	Belém	Sangue	Sensível	(+)
1579		1995	Belém	Fezes	Sensível	(+)
815		2007	Belém	Fezes	Sensível	(+)
1895		2000	Igarapé Miri	Sangue	Sensível	(+)
321		1988	Belém	Fezes	Sensível	(+)
1055		1994	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
1196		1994	Belém	Sangue	Sensível	(+)
143		2008	Bagre	Sangue	Sensível	(+)
15.423		1987	Belém	Fezes	Sensível	(+)
16.294		1992	Belém	Fezes	Sensível	(+)
21.547		1987	Belém	Fezes	Sensível	(+)
228		2004	Ananindeua	Sangue	Sensível	(+)
2506		1980	Belém	Fezes	Sensível	(+)
2756		2008	Portel	Fezes	Intermediário	(+)
28		2008	Belém	Sangue	Sensível	(+)
3291	I	2004	Anajás	Fezes	Sensível	(+)
3333		2004	Colares	Sangue	Sensível	(+)
3844		2001	Anajás	Fezes	Sensível	(+)
4029		2001	Belém	Fezes	Sensível	(+)
4172		1998	Ananindeua	Fezes	Intermediário	(+)
444		1994	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
481		2003	Belém	Fezes	Sensível	(+)
6445		2000	Chaves	Fezes	Sensível	(+)
6499		1998	Belém	Sangue	Sensível	(+)
8666		2006	Barcarena	Fezes	Sensível	(+)
2308		2008	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
7553		2007	Breves	Fezes	Sensível	(+)
3048		2008	Breves	Fezes	Sensível	(+)
6818		2007	Breves	Sangue	Sensível	(+)
172		2008	Marituba	Sangue	Sensível	(+)
7047		2009	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
291		2008	SSBVista	Fezes	Sensível	(+)
6205		2009	Muaná	Sangue	Sensível	(+)
27.500		1981	Belém	Fezes	Sensível	(+)
618		2005	L. Ajurú	Fezes	Sensível	(+)
2796		2006	Breves	Sangue	Intermediário	(+)

(Continuação)

Quadro 12 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster B*

636	XLVIII	2001	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
1270	LX	2006	Portel	Sangue	Sensível	(+)
20.686	XXVI	1986	Belém	Fezes	Sensível	(-)
4232		2001	Abaetetuba	Sangue	Sensível	(+)
4052	VII	2008	Belém	Sangue	Sensível	(+)
16.106		1982	Belém	Fezes	Sensível	(-)
3399	XLI	1999	Belém	Sangue	Sensível	(+)
1432	LI	2002	Anajás	Fezes	Sensível	(+)
2279	LII	2003	L. Ajurú	Fezes	Sensível	(+)
682		2000	Castanhal	Fezes	Sensível	(+)
162	XIII	2003	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
9366	XXXV	1997	Belém	Sangue	Intermediário	(+)
2852	LIV	2004	Marituba	Sangue	Sensível	(+)
4140	LXV	2008	Ananindeua	Sangue	Sensível	(+)
3278		2002	Belém	Fezes	Sensível	(+)
24.992	XVI	1986	Currálinho	Fezes	Sensível	(+)
550		2004	L. Ajurú	Fezes	Sensível	(+)
2257	XVII	2006	Anajás	Fezes	Sensível	(+)
4965	XXXIX	1998	Gurupa	Sangue	Sensível	(+)
8945	XIX	1979	Belém	Fezes	Sensível	(-)
16	XXII	1982	Curionópolis	Fezes	Sensível	(+)
794	XXXIII	1996	Belém	Sangue	Sensível	(+)
24.490	XX	1980	Belém	Fezes	Sensível	(+)
7415	LXIII	2007	L. Ajurú	Fezes	Sensível	(+)
6984		2007	Igarapé Miri	Fezes	Intermediário	(+)
281		1998	Belém	Sangue	Intermediário	(+)
3894		1999	Abaetetuba	Sangue	Sensível	(+)
6607	V	1998	Anajás	Sangue	Sensível	(+)
8254		2006	Abaetetuba	Sangue	Intermediário	(+)
60		2004	P. Pedra	Fezes	Sensível	(+)
2341		2005	Abaetetuba	Fezes	Sensível	(+)
7139		2009	Mocajuba	Fezes	Sensível	(+)
148		1994	Belém	Fezes	Sensível	(+)
1535		2007	Cametá	Fezes	Intermediário	(+)
1572		2001	San Novo	Fezes	Sensível	(+)
540	II	1999	Belém	Fezes	Sensível	(+)
60		1975	Belém	Fezes	Resistente	(+)
51		2004	Belém	Sangue	Sensível	(+)
2721		2005	Cametá	Fezes	Sensível	(+)
119		2005	Cametá	Fezes	Sensível	(+)

(Continuação)

Quadro 12 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster B*

14.881	XXX	1993	Belém	Fezes	Sensível	(+)
2840	XII	2005	Ananindeua	Sangue	Sensível	(+)
388		1997	Belém	Fezes	Sensível	(+)
2434	VI	2003	Currallinho	Sangue	Sensível	(+)
1511		2002	Belém	Fezes	Sensível	(+)
2873		2008	Currallinho	Sangue	Sensível	(+)
98		1996	Portel	Sangue	Sensível	(+)
3077	XXXI	1995	Breves	Sangue	Sensível	(+)
14.930	XXI	1981	Belém	Fezes	Sensível	(+)

No *cluster C* foram agrupados 8 pulsotipos (XLIV, XXXVIII, XIV, XXXIV, XV, XXIX, XXXVI e XXV), de um total de 10 amostras, obtendo-se um percentual de similaridade de 85,8%. Em todas as amostras foi possível observar as variações de tempo (1999, 1998, 1997, 1996, 1991, 1985 e 1981) e espaço (Ananindeua, Belém, Capanema, Santarém, Tailândia e Óbidos). No pulsotipo XV clones com 100% de similaridade foram encontrados em Belém e Óbidos, que são regiões geográficas distantes uma da outra. É válido ressaltar que duas amostras pertencentes a este *cluster* foram isoladas em Óbidos no ano de 1997 e, que em uma amostra isolada no município de Santarém no ano de 1985 não foi possível detectar o gene *viaB*. Dados mostrados no Quadro 13.

Quadro 13 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster C*

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurantoína	<i>viaB</i>
2423	XLIV	1999	Ananindeua	Fezes	Sensível	(+)
9002	XXXVIII	1997	Óbidos	Sangue	Sensível	(+)
4665	XIV	1996	Ananindeua	Sangue	Sensível	(+)
4665		1998	Tailândia	Fezes	Sensível	(+)
4692	XXXIV	1996	Belém	Fezes	Sensível	(+)
27	XV	1997	Óbidos	Fezes	Sensível	(+)
4476		1981	Belém	Fezes	Sensível	(+)
2933	XXIX	1991	Belém	Sangue	Sensível	(+)
6484	XXXVI	1997	Capanema	Sangue	Sensível	(+)
15.163	XXV	1985	Santarém	Fezes	Sensível	(-)

O *cluster* D, apresentou 83,9% de similaridade, entre as amostras IEC 23.558 (pulsotipo XXIV) e IEC 16.473 (pulsotipo XXVII) que compõe o agrupamento genômico. As amostras foram isoladas nos anos de 1985 e 1989 (Quadro 14).

Quadro 14 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster* D

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurantoína	<i>viaB</i>
23.558	XXVII	1989	Curralinho	Fezes	Sensível	(+)
16.473	XXIV	1985	Belém	Fezes	Sensível	(+)

No *cluster* E, encontram-se as amostras IEC 2186 (pulsotipo LII), IEC 4551 (pulsotipo LXVII), IEC 279 (pulsotipo LXVI) e IEC 5664 (pulsotipo LXVIII) que apresentaram 83,4% de similaridade. As amostras possuem diferentes origens e períodos (Quadro 15).

Quadro 15 - Características das *S. Typhi* pertencentes ao *Cluster* E

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurantoína	<i>viaB</i>
2186	LII	2002	Igarapé Miri	Fezes	Resistente	(+)
4551	LXVII	2009	Belém	Fezes	Sensível	(+)
279	LXVI	2008	Cametá	Sangue	Sensível	(+)
5664	LXVIII	2009	P. Pedras	Fezes	Sensível	(+)

O pulsotipo XXIII apresentou 77,1% de similaridade e o pulsotipo XLVI apresentou 78,5% de similaridade mostrando-se mais distantes quando comparados aos demais pulsotipos (Quadro 16).

Quadro 16 - Características das *S. Typhi* não agrupadas em *Clusters*

Registro SABAC/IEC	Pulsotipo	Ano	Procedência	Fonte	Suscetibilidade à Nitrofurantoína	<i>viaB</i>
19.502	XXIII	1984	Belém	Fezes	Sensível	(+)
3511	XLVI	2000	O. Pará	Fezes	Sensível	(+)

#### 4. DISCUSSÃO

A febre tifóide acomete principalmente pessoas que vivem nos países em desenvolvimento, pois, está associada a precárias condições de saneamento básico e de educação em saúde. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as que detêm os índices mais elevados da doença (Brasil, 2008a; 2008b). No Estado do Pará, a febre tifóide é endêmica, possibilitando o relato de um vasto número de surtos ou casos esporádicos em diferentes municípios (Loureiro *et al.*, 2010).

O uso indiscriminado e a administração incorreta de antibióticos usados no tratamento da febre tifóide são fatores que contribuem com o aumento da resistência e multi-resistência a drogas (Akinyemi *et al.*, 2005). Estudos que abordam temáticas voltadas a resistência antimicrobiana, são de fundamental importância, em decorrência de inúmeros relatos na literatura que indicam o aumento de isolados de *S. Typhi* resistente aos mais diferentes fármacos usados no tratamento da doença.

Em vários países da África e da Ásia a resistência ao cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e ampicilina já é uma realidade (Nagshetty, 2010; Kumar, 2009; Kumar, 2008; Akinyemi *et al.*, 2005). No Brasil existem poucos relatos de resistência da *S. Typhi* aos antimicrobianos. No trabalho de Souza *et al.* (2010), com 44 amostras isoladas no Estado do Pará, pôde-se observar resistência a nitrofurantoína (15,90%), ácido nalidíxico (2,28%), tetraciclina (2,28%) e cloranfenicol (2,28%), demonstrando dados mais preocupantes do que os encontrados no presente estudo, onde verificou-se a sensibilidade aos medicamentos de primeira (cloranfenicol) e segunda escolha (ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina, quinolonas e ceftriaxona), e resistência apenas a nitrofurantoína (1,99%).

A resistência a nitrofurantoína é relatada em diferentes sorovares de *Salmonella* (Tsai & Hsiang, 2005). Alguns fatores como o micro-organismo, a taxa de crescimento microbiano, a dinâmica da infecção e medicação prévia afetam bastante a terapêutica e a eficácia de um antibiótico (Sandegren *et al.*, 2008). A resistência bacteriana pode ser em decorrência de mutações,

aquisição de plasmídios, transposons ou integrons de resistência (Ferreira & Campos, 2008).

Elementos que favorecem a multi-resistência a drogas como os integrons não foram encontrados nesta pesquisa. No entanto, em todo o mundo, são referidos estudos que indicam que os genes de resistência podem ser carregados por cassetes gênicos presentes em integrons (Tamang et al. 2007).

No Canadá, no período entre 2000 e 2006, foi realizada genotipagem por PFGE em isolados de *S. Typhi*, e observou-se que isolados resistentes e principalmente os que apresentaram o fenótipo de multi-resistência, indicaram ser altamente relacionados genotipicamente (Demczuk *et al.*, 2010). Resultado semelhante foi obtido neste estudo, onde alguns perfis de resistência e resistência intermediária foram encontrados entre isolados pertencentes aos pulsotipos (III, I, V e II), em diferentes anos, o que indica que estão relacionados genotipicamente, e que fenótipos recentes de resistência ou resistência intermediária podem ter surgido a partir de uma expansão clonal.

Os genes também podem estar associados a virulência de um micro-organismo. A *S. Typhi* possui vários fatores de virulência, inclusive o polissacarídeo Vi, que apresentou-se negativo em 2,65% das amostras aqui estudadas; isto pode ser explicado pelo longo período de armazenamento, pois, quanto maior este período, maior será a probabilidade das cepas perderem a positividade da aglutinação com anti-soros Vi (Maurya *et al.*, 2010). O meio de armazenamento leva a uma pressão seletiva que causa a perda do gene *viaB*, visto que a ilha de patogenicidade (SPI-7) em que ele se encontra é geneticamente instável e pode ser perdida após sucessivos repiques realizados em laboratório (Nair *et al.*, 2004; Bueno *et al.*, 2004). No entanto é difícil explicar porque cepas armazenadas nas mesmas condições não sofreram essas modificações.

O estudo de Baker *et al.* (2005) indicou que o fenômeno de cepas Vi-negativas ocorre naturalmente, pois resultados *viaB*-negativos foram obtidos por PCR realizada diretamente do sangue periférico de pacientes com febre tifóide. Estudos realizados com cepas de isolamento primário ou previamente

estocadas também relatam a detecção de Vi-negativos, resultados que estão de acordo com o obtido no presente estudo (Wain *et al.*, 2005; Scodro *et al.*, 2008).

Isolados Vi-negativos parecem não apresentar dificuldades para o desenvolvimento da infecção; como observado no estudo de Bueno *et al.* (2004), onde a maioria das cepas de *S. Typhi* que não apresentaram a ilha de patogenicidade SPI-7, perderam a capacidade de produzir o antígeno Vi e, em culturas de tecidos foram hiper-invasivas em células epiteliais humanas. Resultado semelhante foi obtido por Zhao *et al.* (2001) em que a expressão do antígeno Vi reprimida levou a maior invasão de células epiteliais e destruição nas placas de Peyer. Quando a expressão do antígeno Vi é reprimida ocorre a secreção de Sips (proteínas de invasão) e formação de flagelos necessários para a invasão (Zhao *et al.*, 2001).

Na genotipagem por PFGE pôde-se concluir que as amostras negativas para a presença do fator de virulência Vi são distinguíveis genotipicamente. Le *et al.* (2007), também demonstrou que isolados Vi-negativos não apresentam forte correlação genotípica.

De acordo com a análise obtida pelo perfil de macro-restrição, as 151 amostras de *S. Typhi*, quando comparadas entre si, independente de sua procedência, fonte de isolamento ou ano, apresentaram elevada similaridade genética que variou de 80 a 100%.

Variações de bandas encontradas nas amostras refletiram em diferentes coeficientes de similaridade observados. As diferenças encontradas nos clones estudados podem ser devido a mudanças no tamanho dos fragmentos de macro-restrição, que podem ocorrer através inserções, deleções, rearranjos ou substituições. Qualquer mudança no tamanho do fragmento corresponde a uma mudança de migração eletroforética, que pode ou não ser detectado visualmente dependendo da magnitude da diferença. Estes eventos genéticos podem influenciar de diferentes formas nos padrões de PFGE, pois, podem ocorrer dentro ou fora do sítio de restrição da enzima (Goering, 2010).

No *cluster* B foi possível observar pulsotipos com 100% de similaridade que circularam desde 1975 e 1980 até 2009. Os dados demonstram que estes

clones adentraram nesta região há décadas atrás, e permaneceram em circulação até os dias atuais, isso indica que esses isolados são altamente estáveis e muito difundidos, revelando as frágeis estratégias de vigilância epidemiológica que tem como um dos seus objetivos impedir ou dificultar a propagação da doença (Brasil, 2008a).

Estes resultados são reforçados por dados encontrados na literatura que indicam a existência de clones que circulam por vários anos. Em Papua Nova Guiné, através de genotipagem por PFGE, pôde-se observar a circulação de vários clones no período entre 1997 e 1999, provavelmente originados de clones que já estavam circulando no período entre 1992 e 1994 (Thong *et al.*, 2002).

Nos clusters B e C pôde-se observar que clones circularam em diferentes municípios (Tracuateua, Belém, Mojú, Portel, Paragominas e Óbidos). Esses municípios são geograficamente distantes uns dos outros, demonstrando que o fluxo populacional ocorrido nos últimos anos, decorrente da construção de novas estradas, construção de novas pontes que interligam municípios, e, do transporte aéreo mais difundido para o interior do Estado, podem ter colaborado para a dispersão e contínua circulação destes clones.

Neste estudo, quando analisadas as fontes de isolamento (sangue ou fezes), pôde-se observar diferenças genotípicas, resultado que discorda com o encontrado por Kam *et al.* (2007), onde os pulsotipos obtidos por PFGE foram indistinguíveis nas cepas isoladas de sangue ou fezes.

No Brasil, existem poucos estudos que enfocam as características genotípicas da *S. Typhi*. Trabalhos realizados no Estado do Pará, através da técnica de PFGE, indicaram a presença de um clone gerando surtos e casos esporádicos de febre tifóide (Bastos *et al.*, 2008; Carreira, 2004). Dados que reforçam os resultados obtidos no presente estudo, no qual, observou-se elevada similaridade entre as amostras, onde pulsotipos forneceram a evidência de que surtos e também casos esporádicos podem ter sido originados a partir de clones que acumularam diversidade genética ao longo dos anos.

É importante a determinação de genótipos em surtos ou casos esporádicos de febre tifóide com a finalidade de identificar a origem de surtos, estabelecer fontes de infecção, compreender melhor a epidemiologia da febre tifóide ao longo de vários anos, além de fornecer meios para facilitar o estudo da propagação de isolados resistentes a fármacos. De modo geral, a caracterização fenotípica e genotípica apresentou grande relevância para a epidemiologia da febre tifóide na região.

## 5 CONCLUSÕES

- Pôde-se observar um baixo percentual de resistência aos antimicrobianos estudados, demonstrando-se que ainda não ocorre o fenômeno de multi-resistência encontrado em diversos países, e que integrons relacionados a resistência ainda não foram encontrados nos clones circulantes no Estado, usando-se os marcadores empregados neste estudo;
- As amostras que apresentaram resistência ou resistência intermediária estão relacionadas genotipicamente, e fenótipos recentes podem ter surgido a partir de uma expansão clonal;
- O gene *viaB* não foi encontrado em algumas amostras, fato este que pode ser devido ao longo período de estocagem;
- Foram observadas diferenças genotípicas quando comparadas amostras isoladas de sangue ou fezes;
- Todas as amostras estudadas apresentaram alta similaridade genética; podendo-se sugerir que surtos e também casos esporádicos foram originados a partir de clones que circulam a quatro décadas em diferentes municípios do Estado do Pará.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINYEMIA, K.O., SMITH, S.I., BOLA OYEFOLU, A.O., COKER, A.O. Multidrug resistance in *Salmonella enteric* serovar typhi isolated from patients with typhoid fever complications in Lagos, Nigeria. **Journal of The Royal Institute of Public Health**, **119**: 321–327, 2005.
- ALECRIM, W.D., LOUREIRO, A.C.S.P., MORAES, R.S., MONTE, R.L., LACERDA, M.V.G. Febre tifóide: recaída por resistência antimicrobiana. Relato de caso. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, **35(6)**: 661-663, 2002.
- ARJYAL, A. & PANDIT, A. Treatment of enteric fever. Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, **2(6)**: 426-430, 2008.
- BAKER, S. & DOUGAN, G. The Genome of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. Supplement article. **Clinical Infectious Diseases**, **45**: 29–33, 2007.
- BAKER, S.; HARDY, J.; SANDERSON, K.E.; QUAIL, M.; GOODHEAD, I.; KINGSLEY, R.A.; PARKHILL, J.; STOCKER, B.; DOUGAN, G. A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. **PLoS pathogens**, **3**: 605-610, 2007.
- BAKER, S., SARWAR, Y., AZIZ, H., HAQUE, A., ALI, A., DOUGAN, G., WAIN, J., HAQUE, A. Detection of Vi-Negative *Salmonella enterica* Serovar Typhi in the Peripheral Blood of Patients with Typhoid Fever in the Faisalabad Region of Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, **43(9)**: 4418–4425, 2005.
- BALODA, S.B., KROVACEK, K., ERICSSON, L., LINNE, T., MANSSON, I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by polymerase chain reaction. **Comparative Immunology and microbiology Infections Diseases**, **18**: 27-26, 1995.

- BASTOS, F. C., LIMA, K. V. B., SÁ, L. L. C., SOUZA, C. O., LOPES, M. L., RAMOS, F. L. P. Variabilidade genética de amostras de *Salmonella* Typhi isoladas de surto e de casos esporádicos ocorridos em Belém, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **44 (4)**: 271-276, 2008.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal Clinical Pathology**, **45**: 493-496, 1966.
- BELKUM, A.V., TASSIOS, P.T., DIJKSHOORN, L., HAEGGMAN, S., COOKSON, B., FRY, N.K., FUSSING, V., GREEN, J., FEIL, E., GERNER-SMIDT, P., BRISSE, S., STRUELENS, M. Guidelines for the validation and Application of Typing Methods for use in Bacterial Epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **13**: 1-46, 2007.
- BELTRAN, P., MUSSER, J.M., HELMUTH, R. Toward population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **85**: 7753–7757, 1988.
- BHAN, M.K., BAHL, R., Bhatnagar, S. Typhoid and Paratyphoid Fever. Seminar. **Lancet**, **366**: 749–62, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: MS, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância e controle da febre tifóide**. Brasília: MS, 2008a.

BRASIL. SINAN/SVS/MS. **Tabela de Casos confirmados de Febre Tifóide.**

**Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1998-2008**, Brasília: MS, 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_febre\\_tifoide.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_febre_tifoide.pdf)>. Acesso em: 22/07/2010b.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. 2º Ed. New York: Springer, 2005.

BRENNER, F.W., VILLAR, R.G., ANGULO, F.J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. Guest Commentary. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 2465-2467, 2000.

BUENO, S. M., SANTIVIAGO, C. A., MURILLO, A. A., FUENTES, J. A., TROMBERT, A. N., RODAS, P. I., YOUNDERIAN, P., MORA, G. C. Precise Excision of the Large Pathogenicity Island, SPI7, in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Journal of bacteriology**, **186(10)**: 3202–3213, 2004.

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.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Typhoid and Paratyphoid Fever**, Atlanta, 2009. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/typhoid-paratyphoid-fever.aspx>>. Acesso em: 18/03/2011.

CLSI, *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. V.29. N°3. 2009.

DAIGLE, F. Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis. Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, **2(6)**: 431-437, 2008.

DATASUS. Ministério da Saúde. **Febre Tifóide - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Brasília: MS, 2011. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/ftifoide/bases/febretifoidebrnet.def>. Acesso em: 31/03/2011.

DEMCZUK, W. H. B., FINLEY, R., NADON, C., SPENCER, A., GILMOUR, M., NG, L.-K., PULSENET CANADA, THE CANADIAN INTEGRATED PROGRAM FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE PUBLIC HEALTH PARTNERSHIP, THE CANADIAN PUBLIC HEALTH LABORATORY NETWORK. Characterization of antimicrobial resistance, molecular and phage types of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolations. **Epidemiology and Infection**, **138(10)**: 1414-26, 2010.

DENG, W., LIOU, S.R., PLUNKETT III, G., MAYHEW, G.F., ROSE, D.J., BURLAND, V., KODOYIANNI, V., SCHWARTZ, D.C., BLATTER, F.R. Comparative Genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. **Journal of Bacteriology**, **185(7)**: 2330-2337, 2003.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DDTHA). Investigação de surto de febre tifóide em Santos, SP, 2004. **Revista de saúde pública**, **39(2)**: 321- 4, 2005.

EICHELBERG, K. & GALÁN, J.E. The Flagellar Sigma Fator FliA ( $\sigma^{28}$ ) Regulates the Expression of *Salmonella* Genes Associated with the Centisome 63 Type III Secretion System. **Infection and immunity**, **68(5)**: 2735-2743, 2000.

EWING, W.H. **Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.**  
4<sup>th</sup>ed. New York. Elsevier, 1986. p. 536.

FADEEL, M.A., CRUMP, J.A., MAHONEY, F.J., NAKHLA, I.A., MANSOUR, A.M., REYAD, B., EL MELEGI, D., SULTAN, Y., MINTZ, E.D., BIBB, W.F. Rapid diagnosis of typhoid fever by enzyme-linked immunosorbent assay detection of *Salmonella* serotype Typhi Antigens in Urine . **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **70(3)**: 323-328, 2004.

FERREIRA, E.O. & CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum. São Paulo, Atheneu, 2008. p.329-338.

FICA, A.C., ALEXANDRE, S.M., PRAT, S.M., FERNÁNDEZ, A.R., FERNÁNDEZ J.O., HEITMANN, I.G. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Enteritidis. **Revista Chilena de Infectología**, **18 (2)**: 85-93, 2001.

FIERER, J. & GUINEY, D.G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **The Journal of Clinic Investigation**: **107**, 2001.

FLUIT, A.C. & SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. Review. **Clinical Microbiology and Infection**, **10**: 272–288, 2004.

FONSECA, E.L., VIEIRA, V.V., CIPRIANO, R., VICENTE, A.C.P. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **Imunology and Medical Microbiology**, **44**: 303-309, 2005.

FRYE, J.G., LINDSEY R.L., RONDEAU G., PORWOLLIK S., LONG F., MCCLELLAND M., JACKSON C.R., ENGLER M.D., MEINERSMANN R.J., BERRANG M.E., DAVIS J.A., BARRETT J.B., TURPIN J.B., THITARAM

- S.N., FEDORKA-CRAY P.J. Development of a DNA Microarray to Detect Antimicrobial Resistance Genes Identified in the National Center for Biotechnology Information Database. **Microbial Drug Resistance**, **16(1)**: 9-19, 2010.
- GALANIS, E., LO FO WONG, D.M., PATRICK, M.E., BINSZTEIN, N., CIESLIK, A., CHALERMCHAIKIT, T., AIDARA-KANE, A., ELLIS, A., ANGULO, F.J., WEGENER, H. C. Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002. for World Health Organization Global Salm-Surv. **Emerging Infectious Diseases**, **12(3)**: 381-8, 2006.
- GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Review. **Infection, Genetics and Evolution**, **7(7)**: 866–875, 2010.
- GRIMONT, P.A.D. & WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovares. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***. France: Institut Pasteur. 2007.
- GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS, P.I., BOCKEMUHL, J., GRIMONT, P.A.D., WEILL. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**, **161**: 26-29, 2009.
- HIROSE, K., TAMURA K., WATANABE, H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. **Microbiology and Immunology**, **47(2)**:161-5, 2003.
- HOARE, A., BITTNER, M., CARTER, J., ALVAREZ, S., ZALDÍVAR, M., BRAVO, D., VALVANO, M.A., CONTRERAS, I. The Outer Core Lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Is Required for

- Bacterial Entry into Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, **74(3)**: 1555–1564, 2006.
- HOFER, C.B. & HOFER, E. Salmoneloses. In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Coura, J.R. (Ed). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2005. p. 1333-1341.
- HOTEZ P.J., KAMATH A. Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **3(8)**: 412, 2009.
- HUNTER S.B., VAUTERIN P., FAIR M.A. L., DUYNE, M.S.V., KUBOTA, K., GRAVES, L., WRIGLEY, D., BARRET, T., RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**:1045–1050, 2005.
- KADHIRAVAN T, WIG N, KAPIL A, KABRA SK, RENUKA K, MISRA A. Clinical outcomes in typhoid fever: adverse impact of infection with nalidixic acid-resistant *Salmonella* Typhi. **BMC Infectious Diseases**, **5**: 37, 2005.
- KAM, K. M., LUEY, K. Y., CHIU, A. W. H.; LAW, C. P.; LEUNG, S. F. S. Molecular Characterization of *Salmonella enteric* Serotype Typhi Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Hong Kong, 2000–2004. **Foodborne Pathogens and Disease**, **4 (1)**: 41-49, 2007.
- KANUNGO, S., DUTTA, S., SUR, D. Epidemiology of typhoid and paratyphoid fever in India. Mini-Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, **2(6)**: 454-460; 2008.

- KARIUKI, S., GILKS, C., REVATHI, G., HART, C.A. Genotypic Analysis of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, **6**: 649-651, 2000.
- KELLER, A., FREY, M., SCHMID, H., STEFFEN, R., WALKER, T., SCHLAGENHAUF, P. Imported Typhoid Fever in Switzerland, 1993 to 2004. **Journal of Travel Medicine**, **15(4)**: 248-251, 2008.
- KIM,S., KIM,S.H., PARK,J.H., LEE, K.S., PARK, M.S., LEE, B.K. Clustering Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolates in Korea by PFGE, Ribotyping, and Phage Typing. *Foodborne Pathogens and Disease*, **6 (6)**: 733-728, 2009.
- KUBOTA, K., BARRETT, T.J., ACKERS, M.L., BRACHMAN, P. S., MINTIZ, E.D. Analysis of *Salmonella enterica* Serotype Typhi Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns Associated with International Travel. **Journal of Clinical Microbiology**, **43(3)**: 1205–1209, 2005.
- KUMAR, S., RIZVIT, M., BERRY, N. Rising prevalence of enteric fever due to multidrugresistant *Salmonella*: an epidemiological study. **Journal of Medical Microbiology**, **57**: 1247–1250, 2008.
- KUMAR, Y., SHARMA, A., MANI, K.R. High Level of Resistance to nalidixic acid in *Salmonella enterica* serovar Typhi in Central India. **Journal of Infection in Developing Countries**, **3(6)**: 467-469, 2009.
- LAMBERTUCCI, J.R., NOBRE JUNIOR,V.A., ÁVILA, R.E. Febre tifóide.In:**Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Coura, J.R. (Ed). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2005. p. 1343-1350.

- LAN, R., REEVES, P.R., OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infection Genetics and Evolution**, **9(5)**: 996-1005, 2009.
- LEDERMANN, D.W. Una historia Del bacilo de Elberth desde Junker hasta Germanier. **Revista Chilena de Infectologia**, Edición aniversario. p: 58-61, 2003.
- LE MINOR, L. & POPOFF. M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **37**: 465–468, 1987.
- LE T.A.H., FABRE, L., ROUMAGNAC, P., GRIMONT, P.A.D, SCAVIZZI, M.R., WEILL, F.X. Clonal Expansion and Microevolution of Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhi in Vietnam from 1996 to 2004. **Journal of Clinical Microbiology**, **45(11)**: 3485–3492, 2007.
- LEVY H., DIALLO S., TENNANT S.M., LIVIO S., SOW S.O., TAPIA M., FIELDS P.I., MIKOLEIT M., TAMBOURA B., KOTLOFF K.L., LAGOS R., NATARO J.P., GALEN J.E., LEVINE M.M. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 1861–1866, 2008.
- LIM, K.B. & THONG, K.L. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. **The Journal of Infection in Developing Countries**, **3(6)**: 420-428, 2009.
- LOUREIRO, E.C.B., MARQUES, N.D.B., RAMOS, F.L.P., REIS, E.M.F., RODRIGUES, D.P., HOFER, E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, **1**: 93-100, 2010.

- LUQUE, C., CISTERNAS, F.A., ARAYA, M. Cambios Del patrón de enfermedad em La postransición epidemiológica em salud em Chile, 1950-2003. **Revista Médica de Chile, 134:** 703-712, 2006.
- LYNCH M.F., BLANTON E.M., BULENS S., POLYAK C., VOJDANI J., STEVENSON J., MEDALLA F., BARZILAY E., JOYCE K., BARRETT T., MINTZ E.D. Typhoid fever in the United States, 1999-2006. **JAMA, 302(8):** 898-9, 2009.
- MAGALHÃES, V.D., FERREIRA, J.C. BARELLI, C., DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, 64(2):** 155-161, 2005.
- MASSI, M.N, SHIRAKAWA, T., GOTH, A., BISHNU, A., HATTA, M., KAWABATA, M. Quantitative detection of *salmonella enterica* serovar Typhi from blood of suspected typhoid fever patients by Real-Time PCR. **International Journal of Medical Microbiology, 295(2):** 117-120, 2005.
- MAURYA, P., GULATI, A. K., NATH, G. Status of vi gene, its expression and *Salmonella* pathogenicity island (spi-7) in *Salmonella* Typhi in India. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, 41 (4):** 913-919, 2010.
- MOEHARIO, L.H. The molecular epidemiology of *Salmonella* Typhi across Indonesia reveals bacterial migration. **The Journal of Infection in Developing Countries. 3(8):** 579-584, 2009.
- NAGSHETTY, K., CHANNAPPA, S.T., GADDAD, S.M. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Typhi in India. **Journal of Infection in Developing Countries, 4(2):** 70-73, 2010.

NAIR, S.; ALOKAM, S., KOTHAPALLI, S.; PORWOLLIK, S.; PROCTOR, E.; CHOY, C.; MCCLELLAND, M.; LIU, S. L.; SANDERSON, K. E. *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains from Which SPI7, a134-Kilobase Island with Genes for Vi Exopolysaccharide and Other Functions, Has Been Deleted. **Journal of Bacteriology**, **186(10)**: 3214–3223, 2004.

NAIR, S., KARIM, R., CARDOSA M.J., ISMAIL G., PANG T. Convenient and versatile DNA extraction using agarose plugs for ribotyping of problematic bacterial species. **Journal of Microbiological Methods**, **38(1-2)**: 63-7, 1999.

OCHIAI R.L., ACOSTA C.J., DANOVARO-HOLLIDAY M.C., BAIQING D., BHATTACHARYA S.K., AGTINI M.D., BHUTTA Z.A., CANH D.G., ALI M., SHIN S., WAIN J., PAGE A.L., ALBERT M.J., FARRAR J., ABU-ELYAZEED R., PANG T., GALINDO C.M., SEIDLEIN L.V., CLEMENS J.D. A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. **Bulletin of the World Health Organization** **86**: 260-268, 2008.

OLSEN S.J., BLEASDALE S.C., MAGNANO A.R. Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960–99. **Epidemiology and Infection**, **130**: 13–21, 2003.

PAI, H., BYEON, J., YU, S., LEE, B.K., KIM, S. *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Isolated in Korea Containing a Multidrug Resistance Class 1 Integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **47(6)**: 2006–2008, 2003.

PARKHILL, J., DOUGAN, G., JAMES, K.D., THOMSON, N.R., PICKARD, D., WAIN, J., CHURCHER, C., MUNGALL, K.L., BENTLEY, S.D., HOLDEN, M.T.G., SEBAIHIA, M., BAKER, S., BASHAM, D., BROOKS, K., CHILLINGWORTH, T., CONNERTON, P., CRONIN, A., DAVIS, P.,

- DAVIES, R.M., DOWD, L., WHITE, N., FARRAR, J., FELTWELL, T., HAMLIN, N., HAQUE, A., HIEN §, T.T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KROGHK, A., LARSENK, T.S., LEATHER, S., MOULE, S., Ó'GAORA, P., PARRY§, C., QUAIL, M., RUTHERFORD, K., SIMMONDS, M., SKELTON, J., STEVENS, K., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enteric* serovar Typhi CT18. **Nature**, **143**: 848-852, 2001.
- PARRY, C.M., HIEN, T.T., DOUGAN, G., WHITE, N.J., FARRAR, J.J.F. Typhoid Fever. Review article. **The New England Journal of Medicine**, **347 (22)**:1770-1782, 2002.
- PARRY, C.M., HO, V.O., PHUONG, L.T., BAY, P.V.B., LANH, M.N., TUNG, L.T., THAM, N.T.H., WAIN, J., HIEN, T.T., FARRAR, J.J. Randomized Controlled Comparison of Ofloxacin, Azithromycin, and an Ofloxacin-Azithromycin Combination for Treatment of Multidrug-Resistant and Nalidixic Acid-Resistant Typhoid Fever. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51(3)**: 819–825, 2007.
- PLOY, M., CHAINIER, D., THI, N.H.T., POILANE, I., CRUAUD, P., DENIS, F., COLLIGNON, A., LAMBERT, T. Integron-Associated Antibiotic Resistance in *Salmonella enteric* Serovar Typhi from Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **47(4)**: 1427–1429, 2003.
- RAFFATELLU, M., WILSON, E.P., WINTER, S.E., BÄUMLER, A.J. Clinical pathogenesis of typhoid fever. Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, **2(4)**: 260-266, 2008.
- RAMOS, F.L.P. **Febre tifóide: a experiência do Instituto Evandro Chagas**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2005. p.71.

RAMOS, F.L.P. **Relatório de Investigação epidemiológica de surto de febre tifóide no município de Mojú, Pará.** Instituto Evandro Chagas/FUNASA/M.S. 1999.

RAMOS, F.L.P. **Relatório de Investigação epidemiológica de surto de febre tifóide no município de Anajás, Pará.** Instituto Evandro Chagas/FUNASA/M.S. 2001.

RAMOS, F.L.P., OLIVEIRA, J.R.S., SILVA, J.C.L. Epidemia de febre tifóide na localidade Cipoal, município de Óbidos, Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31(1)**: 77, Tema Livre n. 136, 1998.

RAMOS, F.L.P. & LINS-LAINSON, Z.C. 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. **Revista Paraense de Medicina**, **11**: 8-13, 1997.

RECCHIA, G.D., HALL, R.M. Genes Cassettes: a new class of mobile element. Review Article . **Microbiology**, **141**: 3015-3027, 1995.

REEVES, M.W., G.M. EVINS, A.A. HEIBA, B.D. PLIKAYTIS AND J.J. FARMER, III. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**: 313–320, 1989.

RIBOT, E.M., GAUTOM, F.R., CAMERON, D.N., HUNTER, S.B., SWAMINATHAN, B., BARRETT, T.J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, **3(1)**: 59-67, 2006.

- RIZZO, C., SANTANTONIO, M., COSCIA, M.F., MONNO, R., VITO, D.D., RIZZO, G. Typhoid Fever in Italy, 2000-2006. Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, **2(6)**: 466-468, 2008.
- ROWE-MAGNUS, D.A. & MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **International Journal of Medical Microbiology**, **292**: 115-125, 2002.
- SÁ, L.L.C., FONSECA, E.L., PELLEGRINI, M., FREITAS, F., LOUREIRO, E.C.B., VICENTE, A.C.P. Occurrence and composition of class 1 and class 2 integrons in clinical and environmental O1 and non-O1/non-O139 *Vibrio cholera* strains from the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105(2)**: 229-232, 2010.
- SALVE, A., PICHEL, M., WIESNER, M., HIDALGO, M., TERRAGNO, R., ÁLVAREZ, A., AGUDELO, C.I., CASTAÑEDA, E., BINSZTEIN, N. Molecular Subtyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolates from Colombia and Argentina. **Foodborne Pathogens and Disease**, **3(1)**: 142-152, 2006.
- SANDEGREN, L., LINDQVIST, A., KAHLMETER, G., ANDERSSON, D.I. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **62**: 495–503, 2008.
- SANTOS, E.O., ROSA, J.F.T., JESUS, I.M., LOUREIRO, E.C.B. A Saúde das Populações da Amazônia Brasileira. In: YARZABAL L, ESPINAL C & ARAGON LE (ed.). **Enfoque Integral de la Salud Humana en la Amazonia**. Caracas: Universidade Central da Venezuela, 1992. p. 95 – 156.
- SCODRO, R.B.L., PÁDUA, R.A.F., GHIRALDI, L.D., FARAH, S.M.S.S., DIAS, J.R.C., SIQUEIRA, V.L.D., CARDOSO, R.F.C. Relato de caso de febre

tifóide no Município de Maringá, Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **41(6)**: 676-679, 2008.

SHINOHARA, N.K.S., BARROS, V.B., JIMENEZ, S.M.C., MACHADO, E.C.L., DUTRA, R.A.F., FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, **13(5)**: 1675-1683, 2008.

SOUZA. C.O., RAMOS, F.L.P., MOTA, C.M., SANTOS, L.V.S., LOPES, M.L. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, **1(2)**: 61-65, 2010.

SOYER, Y., ALCÁINE, S.D., SCHOONMAKER-BOPP, D.J., ROOT, T.P., WARNICK, L.D., MCDONOUGH, P.L., DUMAS, N.B., GRÖHN, Y.T., WIEDMANN, M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Diversity of Human and Bovine Clinical *Salmonella* Isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, **7(6)**: 2010 (no prelo).

TAMANG M. D., OH J. Y., SEOL S. Y., KANG H. Y., LEE J. C., LEE Y. C., CHO D. T., KIM J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi associated with a class 1 integron carrying the *dfrA7* gene cassette in Nepal. **International journal of antimicrobial agents**, **30(4)**: 330-335, 2007.

THAVER, D., ZAIDI, A.K., CRITCHLEY, J., MADNI, S.A., BHUTTA, Z.A. Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). Review. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, **2**: CD004530, 2005.

THONG, K.L., CHEONG Y.M., PUTHUCHEARY S., KOH C.L., PANG T. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from

outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 1135-41, 1994.

THONG, K. L., PUTHUCHEARY, S., YASSIN, R.M., SUDARMONO p., PADMIDEWI M., SOEWANDOJO, E., HANDOJO I., SARASOMBATH S, PANG, T. Analysis of *Salmonella typhi* Isolates from Southeast Asia by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**. **33 (7)**: 1938–1941, 1995.

THONG, K.L., GOH, Y.L., YASIN, R.N., LAU, M.G., PASSEY,M., WINSTON, G., YOANNES, M., PANG, T., REEDER, J.C. Increasing Genetic Diversity of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolates from Papua New Guinea over the Period from 1992 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, **40(11)**: 4156–4160, 2002.

TORPDAHL, M., SKOV, M.N., SANDVANG, D., BAGGESEN, D.L. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **Journal of Microbiology Methods**, **63**: 173–184, 2005.

TSAI, H. J. & HSIANG, P. H. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* and *Campylobacter* in ducks in Taiwan. **The Journal of veterinary medical science**, **67(1)**: 7-12, 2005.

WAIN, J., HOUSE, D., ZAFAR, A., BAKER, S., NAIR, S., KIDGELL, C., BHUTTA, Z., DOUGAN, G., HASAN, R. Vi Antigen Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clinical Isolates from Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, **43(3)**: 1158–1165, 2005.

WHO, World Health Organization. **Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever**. Switzerland, 2003.

WINN Jr, W. C., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. Koneman, **Diagnosticos Microbiológicos: texto e atlas colorido**. Guanabara, Koogan, 2008. 1565p.

ZHAO L., EZAK T., LI Z.Y., KAWAMURA Y., HIROSE K., WATANABE H. Vi-Suppressed wild strain *Salmonella* Typhi cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. **Microbiology and Immunology**, 45(2): 149-58, 2001.

## APÊNDICE 1

Quadro 1: Relação das amostras de *Salmonella* Typhi isoladas a partir de surtos e casos esporádicos de febre tifóide no período de 1970 a 2009.

Registro SABAC/IEC	Gênero	Idade	Ano	Procedência	Fonte de isolamento
29716	M	24	1975	Paragominas	Sangue
60	F	60	1975	Belém	Fezes
2946	M	28	1976	L.Ajuru	Fezes
8945	F	22	1979	Belém	Fezes
2506	F	-	1980	Belém	Fezes
24.49	M	-	1980	Belém	Fezes
4476	M	5	1981	Belém	Fezes
14.93	M	-	1981	Belém	Fezes
27.5	F	-	1981	Belém	Fezes
16	F	-	1982	Curionópolis	Fezes
16.106	F	5	1982	Belém	Fezes
19.502	M	-	1984	Belém	Fezes
16.473	F	-	1985	Belém	Fezes
15.163	M	69	1985	Santarém	Fezes
24.992	F	8	1986	Curralinho	Fezes
20.686	M	-	1986	Belém	Fezes
15.423	M	12	1987	Belém	Fezes
21.547	M	-	1987	Belém	Fezes
321	M	15	1988	Belém	Fezes
9710	M	-	1988	Belém	Fezes
24.909	F	25	1989	Belém	Sangue
23.558	F	13	1989	Curralinho	Fezes
8274	F	49	1989	Abaetetuba	Fezes
32.527	M	-	1990	Belém	Sangue
2933	F	-	1991	Belém	Sangue
16.294	F	17	1992	Belém	Fezes
14.881	M	8	1993	Belém	Fezes
2665	M	-	1994	Belém	Fezes
1196	M	19	1994	Belém	Sangue
1055	F	-	1994	Abaetetuba	Fezes
148	F	16	1994	Belém	Fezes
444	M	-	1994	Abaetetuba	Fezes
1579	M	26	1995	Belém	Fezes
3077	F	24	1995	Breves	Sangue
3171	F	27	1995	Belém	Sangue
3598	M	35	1995	Ananindeua	Sangue

Continuação

Quadro 1: Relação das amostras de *Salmonella* Typhi isoladas a partir de surtos e casos esporádicos de febre tifóide no período de 1970 a 2009.

1125	M	26	1995	Belém	Fezes
794	M	33	1996	Belém	Sangue
98	F	15	1996	Portel	Sangue
4692	M	28	1996	Belém	Fezes
4665	M	5	1996	Ananindeua	Sangue
388	M	25	1997	Belém	Fezes
27	-	-	1997	Óbidos	Fezes
9366	F	9	1997	Belém	Sangue
6484	M	32	1997	Capanema	Sangue
6223	F	4	1997	Paragominas	Fezes
9002	M	39	1997	Óbidos	Sangue
6499	M	9	1998	Belém	Sangue
6607	F	14	1998	Anajás	Sangue
4965	F	26	1998	Gurupa	Sangue
4315	M	29	1998	Abaetetuba	Fezes
4172	M	39	1998	Ananindeua	Fezes
281	F	13	1998	Belém	Sangue
4593	M	34	1998	Marabá	Fezes
4665	F	36	1998	Tailândia	Fezes
3047	F	25	1999	Bagre	Fezes
5630	F	30	1999	Bujaru	Sangue
3894	M	22	1999	Abaetetuba	Sangue
3154	F	22	1999	Barcarena	Fezes
3399	M	14	1999	Belém	Sangue
856	F	7	1999	Acará	Sangue
1259	M	21	1999	Belém	Sangue
2423	M	54	1999	Ananindeua	Fezes
540	M	28	1999	Belém	Fezes
3963	M	2	1999	MUJÚ	Fezes
2668 (16)	M	16	1999	Mojú	Fezes
3540	M	29	2000	Portel	Fezes
3511	M	31	2000	O. Pará	Fezes
1895	F	9	2000	Igarapá Miri	Sangue
682	M	46	2000	Castanhal	Fezes
6445	M	35	2000	Chaves	Fezes
6426	M	26	2000	Belém	Fezes
2532	M	34	2001	Anajás	Sangue
644	M	31	2001	Belém	Sangue
1572	M	42	2001	San Novo	Fezes

Continuação

Quadro 1: Relação das amostras de *Salmonella* Typhi isoladas a partir de surtos e casos esporádicos de febre tifóide no período de 1970 a 2009.

636	F	14	2001	Ananindeua	Fezes
4232	F	13	2001	Abaetetuba	Sangue
3844	M	56	2001	Anajás	Fezes
4029	M	8	2001	Belém	Fezes
2478	M	31	2002	Acará	Fezes
3278	F	10	2002	Belém	Fezes
3040	F	11	2002	Abaetetuba	Fezes
1050	F	24	2002	Tracuateua	Fezes
4103	M	38	2002	Ananindeua	Fezes
1511	M	22	2002	Belém	Fezes
2089	F	7	2002	Igarapá Miri	Fezes
1432	M	13	2002	Anajás	Fezes
2186	M	14	2002	Igarapá Miri	Fezes
6824	M	32	2002	Belém	Sangue
2279	F	12	2003	L.Ajuru	Fezes
2434	M	16	2003	Curralinho	Sangue
2594	M	14	2003	Belém	Sangue
162	F	25	2003	Ananindeua	Fezes
481	M	32	2003	Belém	Fezes
60	M	21	2004	P.Pedra	Fezes
228	M	20	2004	Ananindeua	Sangue
550	F	10	2004	L.Ajuru	Fezes
2852	F	13	2004	Marituba	Sangue
4668	M	26	2004	Belém	Sangue
5935	M	34	2004	Irituia	Sangue
4673	M	11	2004	Igarapá Miri	Fezes
3291	M	37	2004	Anajás	Fezes
5347	M	24	2004	Bagre	Fezes
5749	M	26	2004	Acará	Fezes
3333	F	39	2004	Colares	Sangue
51	F	6	2004	Belém	Sangue
2721	F	6	2005	Cametá	Fezes
2840	M	25	2005	Ananindeua	Sangue
826	M	16	2005	Igarapá Miri	Fezes
618	M	61	2005	L.Ajuru	Fezes
854	M	14	2005	Belém	Fezes
119	M	31	2005	Cametá	Fezes

Continuação

Quadro 1: Relação das amostras de *Salmonella* Typhi isoladas a partir de surtos e casos esporádicos de febre tifóide no período de 1970 a 2009.

2432	F	38	2005	Muaná	Fezes
2341	M	30	2005	Abaetetuba	Fezes
1270	M	35	2006	Portel	Sangue
8254	M	19	2006	Abaetetuba	Sangue
8666	F	19	2006	Barcarena	Fezes
695	F	23	2006	Igarapá Miri	Fezes
2833	M	25	2006	Ananindeua	Fezes
2642	M	31	2006	Castanhal	Fezes
2257	M	91	2006	Anajás	Fezes
2796	M	14	2006	Breves	Sangue
815	M	47	2007	Belém	Fezes
851	M	22	2007	Ananindeua	Fezes
7415	M	29	2007	L.Ajuru	Fezes
1535	M	22	2007	Cametá	Fezes
7621	M	12	2007	Bujaru	Fezes
7553	M	38	2007	Breves	Fezes
7454	M	46	2007	Belém	Sangue
6818	M	22	2007	Breves	Sangue
7016	M	28	2007	Marituba	Fezes
6984	M	26	2007	Igarapá Miri	Fezes
2756	F	36	2008	Portel	Fezes
2873	F	20	2008	Currálinho	Sangue
3048	M	33	2008	Breves	Fezes
4052	M	24	2008	Belém	Sangue
4140	M	11	2008	Ananindeua	Sangue
2308	M	6	2008	Abaetetuba	Fezes
28	M	22	2008	Belém	Sangue
143	M	19	2008	Bagre	Sangue
172	F	38	2008	Marituba	Sangue
279	M	21	2008	Cametá	Sangue
291	F	16	2008	SSBVista	Fezes
4551	M	17	2009	Belém	Fezes
5664	M	21	2009	P. Pedras	Fezes
6205	M	33	2009	Muaná	Sangue
6289	M	20	2009	Belém	Sangue
6823	F	8	2009	Mojú	Fezes
7047	F	32	2009	Abaetetuba	Fezes
7139	M	26	2009	Mocajuba	Fezes
7740	F	28	2009	Portel	Fezes