

TULARÉMIA

I. LOPES DE CARVALHO, M. S. NÚNCIO, J. DAVID DE MORAIS

RESUMO

A tularémia é uma zoonose causada pela bactéria *Francisella tularensis*. O agente etiológico é transmitido ao homem por contacto directo com animais infectados, ar, água, alimentos contaminados ou através de vectores hematófagos. Em Portugal, só em 1998, na sequência de um surto epidémico em Espanha, a Direcção Geral de Saúde emitiu um comunicado alertando os clínicos para a possibilidade da ocorrência da zoonose no nosso país. Neste trabalho, procedeu-se a uma revisão epidemiológica da tularémia com o objectivo de contribuir para um melhor conhecimento desta patologia.

SUMMARY

TULAREMIA

Tularemia is a zoonotic disease caused by *Francisella tularensis*. The etiological agent is transmitted to man by direct contact with infected animals, air, water or contaminated food, or through hematophagous vectors. In Portugal, in 1998, after an outbreak in Spain, the Direcção Geral de Saúde issued a warning, alerting the clinicians to the possibility of the disease spreading throughout the national territory. In this work, an epidemiological review of tularemia is made in order to contribute to the better knowledge of this disease.

I.L.C., M.S.N.: Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa
J.D.M: Serviço de Medicina Interna. Hospital de Espírito Santo. Évora

© 2009 CELOM

INTRODUÇÃO

Francisella spp. pertence ao grupo de γ -proteobacteria e é classificada com base em características de crescimento, reacções bioquímicas e propriedades de virulência. A família *Francisellaceae* inclui as duas espécies do género *Francisella*, *F. tularensis* e *F. philomiragia*¹. A espécie *F. tularensis* engloba quatro subespécies: *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis novicida* e *F. tularensis mediasiatica*.

Apesar de todas as subespécies de *Francisella* estarem associadas a doença no homem, apenas as subespécies *F. tularensis tularensis* e *F. tularensis holarctica* têm uma ampla distribuição geográfica².

F. tularensis é um pequeno cocobacilo Gram-negativo, pleomórfico, aeróbico, catalase-positivo, não móvel. Caracteriza-se como um parasita intracelular facultativo que é capaz de crescer dentro de diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, hepatócitos e células endoteliais^{2,3}.

A parede celular de *F. tularensis* tem um número elevado de ácidos gordos com um perfil único neste género, possuindo as estirpes selvagens uma cápsula rica em lípidos que, visualizada por microscopia electrónica, se apresenta translúcida. A perda desta cápsula pode levar à perda de resistência e virulência, mas não implica a diminuição da viabilidade ou a sobrevivência dentro das células alvo^{3,4}. No seu ciclo celular, *F. tularensis* forma esporos muito resistentes ao stress ambiental, sobrevivendo durante semanas a baixas temperaturas, na água, em solo húmido e em carcaças de animais. A infecção por apenas < 10 organismos pode causar doença em humanos e também em animais^{5,6}.

F. tularensis tularensis (Tipo A) é encontrada predominantemente na América do Norte, apesar de já ter sido isolada na Europa^{2,6}. Esta estirpe, apresenta-se como a mais virulenta das estirpes de *Francisella*. *F. tularensis holarctica* (Tipo B), distribuída pela Europa, Ásia e também América do Norte, é menos virulenta que o Tipo A. A estirpe atenuada utilizada na produção da vacina *F. tularensis* (LVS) é derivada desta subespécie. Das diferentes espécies de *Francisella* isoladas de doentes, *F. tularensis novicida* parece ser a menos virulenta para o homem, tendo sido caracterizada como síndrome tularémia-like nos Estados Unidos da América e Canadá^{3,7}. A espécie de *F. tularensis mediasiatica* apenas foi isolada na Ásia Central, aparecendo mais associada a lebres e ixodídeos^{1,2}.

F. philomiragia foi a designação dada à espécie *Yersinia philomiragia* que, após análise molecular, mos-

trou que não tinha qualquer relação com os outros membros do género *Yersinia*⁸. Posteriormente, foi proposto que fosse transferida para o género *Francisella* com base na similaridade no ADN e na análise dos ácidos gordos. Assim, foi designada *F. philomiragia* comb. nov. e subsequentemente *F. philomiragia*, sendo a segunda espécie reconhecida neste género². Esta espécie já foi isolada nos Estados Unidos da América².

EPIDEMIOLOGIA

A tularémia é uma doença amplamente distribuída no Hemisfério Norte, com focos em algumas partes da América do Norte, Europa e Norte da Ásia^{5,6,9}. A infecção por *F. tularensis* tem sido evidenciada num número muito elevado de espécies selvagens, incluindo lagomorfos, roedores, insectívoros, carnívoros, ungulados, marsupiais, aves, anfíbios, peixes e invertebrados. Os artrópodes, incluindo carraças (*Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Amblyomma americanum*), mosquitos (géneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*) e moscas (*Chrysops* spp.), são potenciais vectores^{7,10}. Os roedores e lagomorfos são apontados como sendo os principais reservatórios desta bactéria^{2,11}, apesar de alguns autores sugerirem que os artrópodes vectores também poderiam servir de reservatório de *F. tularensis*⁵. Contudo, continua por esclarecer qual destes grupos contribui verdadeiramente para a manutenção do agente na natureza.

Em regiões onde a tularémia é endémica, os anticorpos contra *F. tularensis* são frequentemente detectados em animais silváticos.⁷ Os surtos epidémicos em humanos ocorrem quase sempre paralelamente com surtos desta doença em animais, especialmente em roedores e lagomorfos^{12,13}.

As profissões ou ocupações que estão associadas a um risco acrescido de contrair tularémia são pessoas que trabalhem em laboratórios, agricultores, veterinários, pastores, caçadores e pessoas que manuseiem carne crua³.

As principais vias de transmissão são pelo contacto directo com tecidos ou fluidos de animais infectados, por picadas de artrópodes vectores, por ingestão de água ou alimentos contaminados e por via inalatória. A transmissão homem-homem nunca foi descrita¹¹.

Até ao momento foram descritos dois ciclos da doença, terrestre e aquático⁹. No ciclo terrestre, os coelhos e lebres servem tipicamente de hospedeiros vertebrados nos quais ocorre a proliferação do agente patogénico, enquanto que carraças, mosquitos e moscas podem funcionar como artrópodes vectores, perpetuando a doença no ciclo terrestre. No ciclo aquático, *F. tularensis* circula em castores,

ratos almiscarados e arvícolas, podendo ser libertada das carcaças destes animais, resultando na contaminação de rios ou barragens. Não só o contacto directo com a água mas também com o solo contaminado ou lama pode levar à infecção. A interacção entre o ciclo aquático e o terrestre ainda é desconhecida⁵.

Um potencial modo de disseminação do agente é através da comercialização de animais silváticos, capturados em zonas endémicas e vendidos como animais de estimação para regiões geográficas não endémicas. O exemplo mais recente aconteceu em 2002, nos EUA, quando cães da pradaria (*Cynomys ludovicianus*) infectados foram distribuídos por vários países europeus¹⁴. Na Europa de Leste, a caça de hamsters para posterior comercialização também esteve na origem de um surto epidémico ocorrido em 1979³.

Em Espanha, o primeiro surto de tularémia esteve associado com o processamento de carcaças e carne de lebre, tendo sido preponderante a percentagem de mulheres infectadas pelo facto de serem as principais intervenientes nessa actividade.

Outro modo de transmissão de tularémia é através da inalação de aerossóis infectados dispersos por ventiladores, movimentação de terras, corte de arbustos, deposição de feno contaminado ou pelo contacto estrito com animais domésticos infectados. A transmissão do agente por esta via está associada aos casos de tularémia pneumónica, a forma clínica mais grave da doença¹⁵.

Para além da disseminação natural do agente, muitos estudos desenvolvidos por investigadores militares mostraram que pelas suas características *F. tularensis* tem um elevado potencial para ser utilizado como arma biológica em ataques de bioterrorismo, podendo ser lançado no ambiente de forma deliberada, utilizando a via de disseminação dos aerossóis. Durante décadas foram detectadas várias infecções devido à exposição a esta bactéria em laboratório, causando grande morbidade¹⁶.

Nos EUA, em 1995, devido à baixa prevalência de infecção, a tularémia foi retirada da lista de doenças de declaração obrigatória, voltando a fazer parte em 2000 pelo potencial uso de *F. tularensis* em bioterrorismo. Na Europa, em 2003 foi emitido um comunicado para que a tularémia passasse a ser uma doença com vigilância epidemiológica, porém alguns países, como é o caso de Portugal, não integraram este grupo (Decisão nº 2000/96/EC).

Nos EUA, os casos são esporádicos ou ocorrem em pequenos surtos. Na Eurásia, foram descritos centenas de surtos de infecções causadas pela água, através de picada de artrópodes ou pelo ar¹⁷.

Embora a tularémia já tenha sido notificada em muitos países da Europa, em Espanha emergiu pela primeira

vez como doença humana em 1997-1998, com a ocorrência de um surto epidémico¹⁸. Um total de 559 casos de tularémia foram notificados, dos quais 519 pertenciam à província de Castilla-León. Um estudo realizado em 142 doentes da região indicou que 97,2% tinham tido um contacto anterior com lebres, 83,8% tinham esfolado carcaças destes animais e 13,3% tinham manejado carne de lebre. A maioria dos casos (83,8%) apresentava a forma clínica ulceroglandular, como consequência do contacto directo com os animais infectados. Em 1998, ocorreu outro surto em Espanha, na província de Cuenca, associado à pesca de lagostins de água doce, onde foram notificados 19 novos casos⁹. Em 2007, ocorreu um surto associado a arvícolas em Espanha, na província de Castilla-León, tendo sido reportados cerca de 360 novos casos de tularémia¹⁹.

Em Portugal, em 1998, na sequência de um surto epidémico em Espanha, a Direcção Geral de Saúde emitiu um comunicado alertando os clínicos para a possibilidade desta doença se alastrar ao território nacional, quer por extensão do surto quer por ocorrência de casos isolados (Decisão nº 2003/534/CE). A inclusão deste agente na lista dos agentes potencialmente utilizáveis em bioterrorismo, juntamente com o carácter endémico que a doença tem em Espanha, relançou o interesse por esta patologia no nosso país.

Do ponto de vista epidemiológico, em Portugal já tinha sido amplamente assinalada a presença de algumas espécies de artrópodes com capacidade vectorial, como por exemplo *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatum* e *D. reticulatus*²⁰. Igualmente, estava bem documentada a presença das espécies consideradas como sendo os reservatórios mais eficientes, os lagomorfos *Lepus granatensis* e *Oryctolagus cuniculus* (lebre e coelho-bravo) e os roedores *Rattus* sp. e *Mus musculus* (ratazana e rato doméstico)²¹.

Entre 2001-2002, na região Norte de Portugal realizou-se um estudo seroepidemiológico em 203 indivíduos assintomáticos onde foi possível detectar uma prevalência de anticorpos de 8,9%²². Em 2007, na sequência de um projecto realizado no CEVDI/INSA, detectou-se *F. tularensis holarctica* tanto numa amostra humana como num ixodídeo, colhidos na região de Bragança²³. A inexistência de relatórios reportando a ocorrência de casos humanos pode ser explicada pelo facto da espécie detectada apresentar uma disseminação mais lenta e provocar uma forma menos severa da doença, aliado ao facto da tularémia não se encontrar incluída na lista de doenças de declaração obrigatória e da pouca sensibilização dos médicos para esta problemática.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

As consequências clínicas de uma infecção por *F. tularensis* dependem da virulência do organismo infectante, da porta de entrada, do volume do inóculo, da extensão do envolvimento sistémico e do estado do sistema imunitário do hospedeiro. O resultado pode variar desde casos assintomático a uma septicémia aguda seguida de morte rápida. As principais apresentações de doença incluem as formas ulceroglandular, glandular, oculoglandular, orofaríngea, pneumónica, tífica e séptica. Esta classificação artificial enfatiza apenas as manifestações mais predominantes encontradas na maioria dos doentes^{2,3}.

O período de incubação é habitualmente de três a cinco dias, mas pode variar entre um e 21 dias³. O início de doença é usualmente brusco, com febre (38-40°C), cefaleias, arrepios de frio, rigidez da nuca, mialgias (predominantemente lombares), síndrome tipo gripal e odinofagia. Tosse seca e dor ou aperto retro-esternalis podem ocorrer associados a sinais objectivos de pneumonia, tais como expectoração, dispneia, taquipneia, dor na pleura ou hemoptise. Algumas vezes ocorrem ainda náuseas, vómitos e diarreia. A fase subsequente é caracterizada por suores, febre e arrepios de frio, astenia, anorexia e perda de peso¹¹.

Na forma ulceroglandular, a manifestação típica que surge depois do manuseamento de carcaças contaminadas ou após a picada de um artrópode infectado consiste numa pápula cutânea no local de inoculação, em simultâneo com outros sintomas generalizados, e que se torna purulenta e ulcerada poucos dias após o seu aparecimento. A úlcera é mole, geralmente tem um carácter indolor e pode vir a cobrir-se por uma escara. Tipicamente, um ou mais nódulos linfáticos aferentes podem tornar-se maiores e moles poucos dias após o aparecimento da pápula¹¹.

Na forma oculoglandular, após a contaminação directa do olho ocorre ulceração da conjuntiva acompanhada de equimoses, vasculite e linfadenite localizadas.

A forma glandular de tularémia é caracterizada por detecção de linfadenopatia sem úlcera³.

A forma orofaríngea é adquirida pela ingestão de água ou alimentos contaminados e, algumas vezes, pela inalação de aerossóis. Algumas das pessoas infectadas podem desenvolver estomatites, mas mais geralmente desenvolvem faringite exsudativa ou amigdalite, algumas vezes com ulceração. Pode ainda ocorrer linfadenopatia cervical ou retrofaríngea pronunciada³.

A tularémia pneumónica pode ser o resultado directo da inalação de aerossóis contaminados ou seguir-se à disseminação hematogénea a partir de um outro local do organismo. A libertação destes aerossóis pode resultar em

doença aguda, com sinais e sintomas de faringite, bronquite, pleuropneumonia e linfadenite, acompanhada por manifestações de doença sistémica. No entanto, as exposições por inalação resultam comumente num quadro clínico inicial de doença sistémica sem sinais claros de doença respiratória¹¹. Os primeiros sinais pulmonares imagiológicos de tularémia por inalação podem ser infiltrados peribrônquicos, que tipicamente avançam para broncopneumonia em um ou mais lóbulos e que normalmente são acompanhados por efusões pleurais e linfadenopatia. Contudo, os sinais podem ser mínimos ou mesmo inexistentes, e alguns doentes poderão mostrar apenas um pequeno infiltrado pulmonar ou lesões granulomatosas difusas do parênquima pulmonar ou da pleura¹¹.

A designação de forma tífica aplica-se para descrever uma doença sistémica, cujo diagnóstico se pode confundir com a febre tifóide, com ausência de sinais no local de infecção. Algumas vezes, estes doentes apresentam manifestações gastrointestinais intensas, tais como diarreia e cólicas³.

A forma séptica é potencialmente grave e muitas vezes fatal. Tal como na forma tífica, podem ser detectados sinais não específicos, tais como febre, diarreia e vómitos que podem ser desde cedo proeminentes. Os doentes *tipo* apresentam sintomas de infecção, podendo apresentar estado confusional e coma. Se a doença não for tratada atempadamente, pode ocorrer choque séptico e outras complicações típicas de **Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica**, incluindo coagulação intravascular disseminada e hemorragia, Síndrome Respiratório Agudo e falência multi-órgãos¹¹.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de tularémia depende da suspeição clínica. Os resultados dos testes laboratoriais de rotina não são específicos. A contagem de leucócitos e a velocidade de sedimentação podem ser normais ou elevadas, contudo trombocitopenia, hiponatremia, transaminases elevadas, aumento de fosfoquinase, creatinina, mioglobulinúria e piúria estéril são ocasionalmente encontrados. O microrganismo é raramente visto em esfregaços, corados com coloração de Gram ou em biópsias de tecido³.

Amostras Bacteriológicas

Quando existe suspeição clínica de tularémia, devem ser feitos paralelamente exames microbiológicos e, para isso, devem ser enviadas para o laboratório as amostras adequadas. Pelo facto de se tratar de um microrganismo muito infeccioso, o laboratório deve ser

informado que as amostras podem conter *F. tularensis*, para preparar o trabalho a efectuar e os meios a disponibilizar.

O tipo de amostra a utilizar no diagnóstico laboratorial depende das manifestações clínicas que o doente apresenta e inclui esfregaços da lesão ou zaragatoas, sangue total, urina, biópsia, aspirado ou raspagem (úlceras, nódulo linfático, córnea ou tecido afectado) e amostras respiratórias (expectoração, lavado brônquico ou pleural). Num contexto de surto epidémico ou num estudo epidemiológico, devem ser examinados artrópodes potenciais vectores, como as carcaças dos animais, fezes dos hospedeiros vertebrados e amostras de água. Infelizmente, a padronização dos protocolos para estudar este tipo de amostras continua ainda por estabelecer, embora existam *guidelines* do Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) das boas práticas laboratoriais que são usualmente adoptadas³.

Cultura

De acordo com o CDC, a cultura continua a ser a técnica de referência para a confirmação laboratorial de infecção por tularémia. Contudo, esta técnica tem sido um desafio, particularmente com *F. tularensis tularensis* e com *F. tularensis holarctica*. Estas duas subespécies têm um crescimento lento, são organismos exigentes que requerem compostos de sulfidrilos e 24-72 horas para crescer em meio artificial a uma temperatura de 37° C. *F. tularensis* pode ser cultivada *in vitro* em meio de cultura líquido ou sólido adequado²⁴.

Habitualmente as estirpes de *F. tularensis* isoladas a partir de amostras clínicas desenvolvem-se bem em diversos meios, incluindo agar de chocolate (CA), agar de cisteína enriquecido com sangue achocolatado (9%) (CHAB) e agar de extracto de fermento de carvão tamponado (BYCE)²⁴. O meio CHAB é o mais recomendado como meio de cultura, por o seu crescimento dar indicação sobre a identificação presuntiva de *F. tularensis* e por este microrganismo apresentar um crescimento característico neste meio (verde opalescente, colónias brilhantes às 24-48 horas). Uma vez que um isolado puro tenha sido recuperado, a fermentação por glicerol pode ser usada para diferenciar tipo A (*F. tularensis tularensis*) – faz a fermentação de glicerol – de tipo B (*F. tularensis holarctica*) – não faz fermentação de glicerol¹⁰.

Mesmo em meio adequado, como no meio *Mueller-Hinton* modificado, o crescimento desta bactéria é lento e pode levar três a sete dias quando agitado ou mais de 10 dias quando não agitado^{5,10}. Para otimizar os resultados, a utilização de suplemento de antibióticos para prevenir

um elevado crescimento de flora contaminante, a manutenção das placas e do meio líquido a 35-37° C e a manutenção de um período de incubação de sete a 10 dias (especialmente quando se trata de amostras de doentes cuja antibioterapia já havia sido instituída) são alguns dos procedimentos aconselhados.

O isolamento de *F. tularensis* a partir de amostras de sangue tem sido referido nas várias formas da doença. Na tularémia pneumónica, tífica ou septicémica a taxa de sucesso de isolamento a partir de amostras de sangue apresenta resultados mais promissores. O uso de sistemas comerciais de culturas de sangue BACTEC™ (BD) ou BacT/Alert™ (bioMerieux, Hazelwood, IL, USA) mostraram dar resultados positivos em doentes infectados com tularémia²⁵. Contudo, continua por determinar se a inoculação das amostras de zonas esterilizadas (líquido pleural, liquor) nestes sistemas de cultura de sangue é superior à cultura em meio sólido ou em meio líquido convencional²⁶.

Como já foi referido, esta bactéria é conhecida por causar infecções laboratoriais, pelo que o manuseamento de estirpes e tentativa de isolamento só deverão ser realizados em laboratórios de nível de segurança três (*Biosafety Level 3* ou BSL-3)³. Apesar desta limitação, o isolamento do agente continua a ser o método mais recomendado, pois permite um diagnóstico conclusivo da infecção e um valioso recurso para a epidemiologia molecular⁵.

Identificação Microbiológica de *F. tularensis*

Os primeiros testes bioquímicos de triagem permitem apenas a identificação presuntiva, que deverá ser confirmada por técnicas imunológicas e moleculares. Poucos testes bioquímicos adicionais, nomeadamente a capacidade de fermentação da glucose, glicerol ou a presença de via da citrulina ureidase, permitem a identificação do subtipo. Recentemente, o sistema comercial Microlog Microstation™ (Biolog, CA, USA) é usado para diferenciar entre *F. tularensis tularensis* e *F. tularensis holarctica*. A diferenciação baseia-se apenas na capacidade para fermentar glicerol, e por isso deve ser olhada com precaução¹⁰.

Uma técnica alternativa para a identificação de *Francisella* é a análise da composição dos ácidos gordos celulares utilizando o sistema comercial MIDI™ (MIDI, Newark, NJ, USA). Este sistema identifica também estirpes atípicas de *F. tularensis* que não apresentam cisteína na constituição da sua parede celular¹¹.

A análise por *immunoblot* de bactérias suspeitas, utilizando um anti-soro específico ou um anticorpo monoclonal anti-*F. tularensis*, pode ser usado para a identifica-

ção do microrganismo²⁷. A técnica de imunofluorescência é adequada para a identificação de colónias assim como para a detecção específica do agente patogénico em amostras clínicas¹⁰.

Métodos Moleculares para Detecção, Identificação e Tipagem de *F. tularensis*

O uso da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é muito útil quando as culturas são negativas ou o isolamento microbiológico é impraticável por não estarem reunidas as condições de segurança exigidas para a execução desta técnica.

Estes ensaios, embora muito sensíveis quando se estudam isolamentos efectuados em meios artificiais, são menos sensíveis quando aplicados a amostras biológicas, podendo ocorrer resultados falsos negativos^{3,10}. Para contornar esta limitação, vários métodos e protocolos de PCR têm sido descritos para a detecção de ADN de *F. tularensis*, tanto em amostras clínicas como ambientais⁵.

PCR Convencional

Os genes que codificam a membrana superficial da lipoproteína (*tul4*) de *F. tularensis* foram o primeiro alvo do desenvolvimento da técnica de PCR aplicada à detecção do agente em amostras de sangue, aerossóis e tecidos de rato infectados experimentalmente⁵. Este protocolo, seguido pela confirmação da identidade dos produtos de PCR por sequenciação, RLB (*reverse line blotting*) ou por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), mostrou ser mais sensível comparativamente à cultura, embora seja menos sensível que a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR)²⁸. Com efeito, de acordo com a bibliografia, o protocolo de PCR *Tul4* apresentou uma sensibilidade de 75% quando aplicado a amostras de tecidos de doentes com tularémia ulceroglandular^{25,30}. A utilização de um método de extracção de ADN optimizado em combinação com a utilização do PCR *nested* para *fopA*, gene que codifica a proteína de membrana externa de 43 kDa, permitiu um aumento no limite de detecção para 10² CFU/ml em sangue^{5,10,29}. Assim, ambos os protocolos mostram uma boa especificidade e aceitável sensibilidade na detecção de *F. tularensis*, podendo ser aplicados ao diagnóstico de tularémia em doentes que já se encontrem a receber terapia empírica, pelo que cada vez é mais frequente a sua utilização^{3,5}.

Além da aplicação na clínica, os mesmos protocolos de PCR já foram utilizados com sucesso na detecção de *F. tularensis* em carraças e amostras obtidas a partir do meio ambiente¹⁰.

PCR em Tempo-Real

A introdução da técnica de RT-PCR como TaqManTM (Applied Biosystems, Munich, German) ou *Light Cycler Technology* (Roche Molecular Biochemicals, USA) trouxe grandes avanços ao diagnóstico das doenças infecciosas.

No estudo da tularémia, o primeiro protocolo de RT-PCR desenvolvido foi o TaqManTM tendo como alvo o gene *fopA*, que tem um limite de detecção de 1pg DNA genómico (< 100 CFU) que é similar ao protocolo de *polymerase chain reaction – enzyme immunoassay* (PCR-EIA) baseado nas sequências de *tul4*. Os dois protocolos são específicos quanto ao género e provaram ser adequados à detecção de ADN de *F. tularensis*, contudo a sensibilidade e a especificidade do ensaio PCR-EIA ficaram aquém do esperado¹⁰.

O ensaio múltiplo de RT-PCR Taq-ManTM altamente sensível e específico, tendo como alvo quatro genes (*ISFtu2*, 23 kDa, *tul4*, *fopA*), mostrou-se mais sensível do que a cultura, quando aplicada em amostras ambientais contaminadas ou tecidos de roedores infectados tanto natural como experimentalmente.^{10,32} Além de aumentar a sensibilidade para um limite de detecção de ~1 CFU, este ensaio múltiplo tem a vantagem de diminuir a probabilidade de aparecimento de falsos negativos. Contudo, apesar deste ensaio representar um instrumento valioso e específico em relação à detecção de *F. tularensis*, ainda é necessária uma avaliação da sua aplicação ao diagnóstico laboratorial¹⁰.

Tipagem Molecular das Estirpes de *F. tularensis*

A diferenciação entre as subespécies mais virulentas (*F. tularensis tularensis*) das subespécies menos virulentas (*F. tularensis holarctica*) tem um grande interesse clínico, principalmente em áreas onde as duas subespécies ocorrem naturalmente, como é o caso da América do Norte¹⁰. Para além da técnica de PCR, que permite a rápida detecção de *F. tularensis*, muitos outros métodos moleculares foram desenvolvidos com o objectivo de fazerem a discriminação entre as subespécies ou até mesmo estirpes^{25,31}.

Estes métodos moleculares baseiam-se em sistemas de eletroforese em géis de agarose e centram-se na detecção das diferenças dos tamanhos dos produtos amplificados por PCR. A genotipagem feita pelos métodos de PFGE (*pulse-field gel electrophoresis*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), sequenciação do gene 16S rDNA e RFLP mostram vantagens apenas na discriminação das subespécies de *F. tularensis*. Assim, a análise de SSTR (*short-sequence tandem repeats*), ou VNTR (*variable number tandem repeats*) aparece como uma fer-

ramenta poderosa na discriminação individual das estirpes²⁶. Este facto tem sido confirmado pela análise de MVLA (*multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*). Este método poderá fornecer mais detalhe nos aspectos ecológicos e é a base para os estudos de diferenciação molecular das estirpes de *F. tularensis*^{5,34}.

O uso de *microarrays* pode também ajudar a identificar não só as variações genéticas, que são úteis ao diagnóstico, mas também marcadores de patogenicidade e virulência. Esta técnica tem sido referida por conseguir distinguir cada uma das quatro subespécies de *F. tularensis*³⁵. Uma das oito zonas de diferenciação identificada pela análise de *microarray* foi reanalisada em detalhe por amplificação e posteriormente por sequenciação. Esta análise demonstrou que esta zona é muito diferente nas várias estirpes de *F. tularensis*¹⁰.

Métodos Serológicos para a Detecção de *F. tularensis*

Os estudos serológicos são a forma comum de confirmar o diagnóstico de tularémia. A confirmação serológica definitiva requer a observação de seroconversão, ou seja, a detecção do quádruplo ou mais de aumento nos títulos de anticorpos específicos presentes em duas amostras de soro consecutivas, colhidas respectivamente na fase aguda e convalescente da doença¹⁰.

Durante décadas, o teste de aglutinação (reacção de Widal) foi o ensaio mais usado⁷. Neste momento, estão disponíveis as técnicas de aglutinação em tubo, microaglutinação, hemaglutinação, *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) e *immunoblot* para detecção de anticorpos de *F. tularensis*^{3,7,36}. Correntemente, os ensaios de aglutinação são ainda largamente utilizados e são os únicos comercialmente disponíveis em muitos países^{10,18}. Estas técnicas serológicas detectam infecções causadas pelas subespécies *tularensis* e *holarctica*, mas são em geral negativas nos casos associados à subespécie *novicida* e *F. philomiragia*²³. Os ensaios padrão da técnica de aglutinação em tubo são normalmente negativos na primeira semana da doença, positivos em muitos doentes ao fim de duas semanas, atingindo o pico após quatro a cinco semanas de infecção³.

A técnica de microaglutinação é 100 vezes mais sensível do que o método de aglutinação em tubo. Os anticorpos IgM e IgG são detectados em simultâneo e é habitual persistirem com títulos elevados por mais de uma década após a infecção, limitando o valor de um só resultado positivo³.

A técnica de ELISA é referida como sendo mais sensível do que os métodos de aglutinação e tem a vantagem de detectar separadamente diferentes classes de anticorpos¹⁰.

Como já foi referido, o diagnóstico serológico definitivo requer que haja um aumento no título de anticorpos presentes nas amostras dos doentes, podendo ser necessário repetir o teste em intervalos de sete a dez dias. Nestes testes, a ocorrência de reacções cruzadas com antígenos de outras bactérias, como *Brucella* spp., *Proteus* OX19 e *Yersinia* spp., que permitem a possibilidade de resultados falso positivos, já foi referida na bibliografia. Contudo, sempre que a infecção é provocada por *F. tularensis* os títulos de anticorpos específicos contra este agente são quase sempre superiores. Para minimizar a ocorrência de reacções cruzadas é recomendado o tratamento dos soros com dithiothreitol²⁴.

Actualmente, a combinação entre um teste de triagem (ELISA) e um teste confirmatório (*immunoblot*) pode ser uma aproximação fiável, em duas etapas, para o diagnóstico serológico de tularémia²⁷.

TRATAMENTO

A estreptomicina é o antibiótico de eleição no tratamento de todas as formas de tularémia, excepto nas situações de meningite^{3,7,11}. A dosagem mínima de estreptomicina no tratamento efectivo de tularémia é 7,5-10 mg/kg intramuscular, de 12 em 12 horas, durante 7 a 14 dias. O regime alternativo é 15 mg/kg de 12 em 12 horas nos primeiros três dias, seguido de metade desta dose para completar o tratamento. Nos casos graves, a dose pode ser aumentada para 15 mg/kg de 12 em 12 horas, durante 7 a 10 dias. Estudos *in vivo* demonstraram que doses mais altas do que 2 g/dia de estreptomicina não aumentam a eficácia do tratamento³.

Nas crianças, o regime de tratamento é similar, 30 a 40 mg/kg/dia em duas doses durante um total de sete dias ou 40 mg/kg/dia em duas doses nos primeiros três dias, seguido de 20 mg/kg/dia em duas doses divididas nos quatro dias seguintes^{3,11}.

Em alternativa ao tratamento com estreptomicina está preconizado o uso de gentamicina, embora a percentagem de recaídas e de insucesso sejam mais elevadas neste segundo regime³⁷. Contudo, nos doentes pediátricos a gentamicina mostra-se efectiva no tratamento de tularémia. Este antibiótico é administrado por via endovenosa, 3 a 5 mg/kg/dia em duas doses, durante 7 a 14 dias, sendo desejáveis níveis no soro de pelo menos 5 µg/mL. A eficácia de uma só dose por dia ainda não foi estudada³. Devido à sua nefrotoxicidade as doses de estreptomicina e de gentamicina devem ser ajustadas nos casos de insuficiência renal e nos indivíduos idosos.

A capacidade de penetração destes fármacos ao nível do sistema nervoso central e no líquido cefalorraquidiano é pobre, pelo que pode ser inadequada em casos de meningites por tularémia. O tratamento que geralmente tem mais sucesso nestes casos inclui a associação de estrep-tomicina com cloranfenicol, ou de gentamicina com doxiciclina³.

As tetraciclina e o cloranfenicol podem também ser utilizados no tratamento de tularémia, contudo quer recalcadas quer tratamentos primários sem sucesso ocorrem com maior frequência com estes agentes bacteriostáticos do que com os aminoglicosídeos, e devem ter a duração de pelo menos 14 dias para controlar estas situações^{3,11,37}. A tetraciclina não deve ser administrada em crianças com menos de oito anos de idade, durante a gravidez ou durante o aleitamento. A tetraciclina é mais eficaz nos adultos quando é prescrita em doses orais de dois g/dia divididas durante 14 dias. A dosagem para as crianças é de 30 mg/kg/dia, para um máximo de dois g/dia, em doses divididas com a mesma duração. Na generalidade, o cloranfenicol não deve ser escolhido para o tratamento de tularémia devido à sua alta toxicidade³.

As fluoroquinolonas, que tem actividade intracelular, também são possíveis candidatas para o tratamento da tularémia¹¹. Os medicamentos com eficácia clínica comprovada mostraram concentrações mínimas inibitórias contra *F. tularensis* em testes de sensibilidade *in vitro*.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

- GARRITY GM, BELL JA, LILBURN TG: Taxonomic outline of the Prokaryotes, 2nd ed. MI, USA. Bergey's Manual of Systematic Bacterol 2004
- SJOSTEDT A: Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann NY Acad Sc 2007;1105:1-29
- MANDELL G, BENNETT J, DOLIN R: Principles and Practice of Infectious diseases, 7th ed. Elsevier, New York: Churchill Livingstone 2005
- OLSUFJEV NG, EMELYANOVA OS, DUNAYEVA TN: Comparative Study of Strains of Bacterium tularensis. II. Evaluation of Criteria of Virulence of Bacterium tularensis in the old and the new world and their taxonomy. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunobiol 1959;3:138-149
- PETERSEN JM, SCHRIEFER ME: Tularemia: emergence/re-emergence. Vet Res 2005;36:455-7
- GURYCOVA D: First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. J Epidemiol 1998;38:4180-5
- FELDMAN KA: Tularemia: JAMA 2003;222(6):725-730
- URSING J, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ: Lack of genetic relatedness between *Yersinia philomiragia* (the *Philomiragia bacterium*) and *Yersinia* species. Curr Microbiol 1980;4:231-3
- ANDA P, SEGURA DEL POZO J, GRACIA JMD et al: Waterborne Outbreak of Tularemia Associated with Craying Fishing. Emerg Infect Dis 2001;7(3):575-582
- SPLETTSTOESSER DW, TOMASO H, AL DAHOUK S, NEUBAUER H, SCHUFF-WERNER P: Diagnostic Procedures in Tularaemia with Special Focus on Molecular and Immunological Techniques. J Vet Med 2005;B52:249-261
- DENNIS DT, INGLESBY TV, HENDERSON DA et al: Tularemia as a biological weapon. JAMA 2001;285(21):2763-73
- MORNER T: The ecology of tularemia. Ver Sci Tech Off Int Epiz 1992;11:1123-30
- TARNVIK A, SANDSTROM G, SJOSTEDT A: Epidemiological analysis of tularaemia in Sweden 1931-1993. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;13:201-4
- AVASHIA S, PETERSEN JM, LINDLEY CM et al: First reported prairie dog-to-human tularaemia transmission, Texas, 2002. Emerg Infect Dis 2004;10:483-6
- FELDMAN KA, ENSCORE RE, LATHROP BT et al: An outbreak of primary pneumonic tularaemia on Martha's Vineyard. N Engl J Med 2001;29:1601-6
- BURKE DS: Immunization against tularaemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularaemia. J Infect Dis 1977;135:55-60
- CHRISTENSON B: An outbreak of tularaemia in the northern part of Central Sweden. Scand J Infect Dis 1984;16:285-290
- GUTIERREZ MP, BRATOS MA, GARROTE JI et al: Serologic evidence of human infection by *Francisella tularensis* in the population of Castilla y León (Spain) prior to 1997. FEMS Immunol Medical Microbiol 2003;35:165-9
- MARTIN C, GALLARDO MT, MATEOS L et al: Outbreak of Tularemia in Castilla y León, Spain. Eurosurveillance 2007;12(11): Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ew/>
- SILVA MM, SANTOS AS, FORMOSINHO P, BACELLAR F: Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. Acta Med Port 2005;19:39-48
- HOPLA CE: The ecology of tularemia. Adv. Vet Sci Comp Med 1974;18:25-53
- SEABRA J, SANTOS MA, PEREIRA H, VICENTE P, VASCONCELOS O, SANTO A: Prevalence of *Francisella tularensis* antibodies in the population of North of Portugal. In: Abstracts of the Prevention and Control of Zoonoses; Cardiff, Wales, UK; 2002 Oct 21-23. Cardiff (Wales); Health Protection Agency; 2002. [Abstract 110]
- LOPES DE CARVALHO I, ESCUDERO R, FALCÃO H, GARCIA AMIL C, ANDA P, NÚNCIO MS: *Francisella tularensis*, Portugal. Emerg Infec Dis 2007;13(4):666-7
- MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH: Manual of clinical microbiology, 7th ed. Washington DC: ASM Press 1999
- JOHANSSON A, BERGLUND L, ERIKSSON U et al: Comparative Analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularaemia. J Clin Microbiol 2000;38:22-6
- BRION JP, RECULE C, CROIZE J, STAHL JP, MICOUD M:

Isolation of *Francisella tularensis* from lymph node aspirate inoculated into a non-radiometric blood culture system. Eur J Clin Microbiol 1996;41:2924-1

27. SCHMITT P, SPLETTSOESSER W, PORSCH-OZCURUMEZ M, FINKE EJ, GRUNOW R: A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularaemia. Infect Epidemiol 2005;133:757-766

28. SYRJALA H, KOSKELA T, RIPATTI T, SALMINEN A, HERVA E: Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical severities of the disease. J Infect Dis 1986;153:142-5

29. FULOP M, LESLIE D, TITBALL R: A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1996;54:364-6

30. KARHUKORPI E-K, KARHUKORPI J: Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularaemia with polymerase chain reaction. Scand. J. Infect. Dis 2001;33:382-5

31. PUENTE-REDONDO VA, GARCIA del BLANCO N, GUTIERREZ-MARTIN CB, GARCIA-PENA FJ, RODRIGUEZ FERRI EF: Comparison of Different PCR Approaches for Typing of *Francisella tularensis* Strains. J Clin Microbiol 2000;38(3):1016-2

32. VERSAGE JL, SEVERIN DD, CHU MC, PETERSEN JM: Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol 2003;54:5492-9

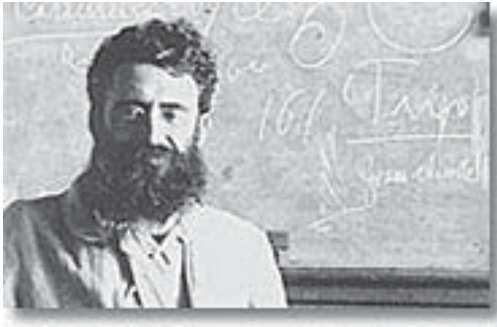
33. JOHANSSON A, GORANSSON I, LARSSON P, SJOSTEDT A: Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. J Clin Microbiol 2001;39:3140-6

34. JOHANSSON A, GORANSSON I, LARSSON P et al: Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable number of tandem repeat analysis. J Bacteriol 2004;186:5808-18

35. BROEKHUIJSEN M, LARSSON P, JOHANSSON A: Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrate Genetic Conservation within the Species but Identify Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. J Clin Microbiol 2003;41(7):2924-1.

36. BEVANGER L, MAELAND JA, KVAN AI: Comparative analyses of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. Clin Diagn Lab Immunol 1994;1:238-240

37. ENDERLIN G, MORALES L, JACOBS RF, CROSS TJ: Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularaemia: review of literature. Clin Infect Dis 1994;19:42-7



Ricardo Jorge



INSA