

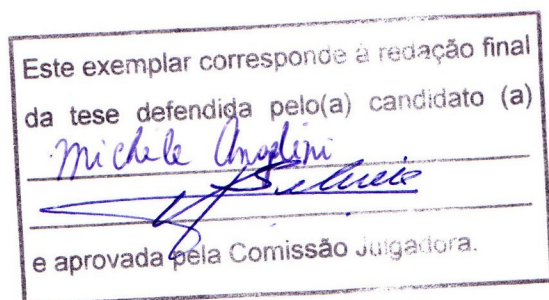
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Michelle Angelini

“Estudo molecular e comparado de linhagens de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, isoladas de casos de shigelose das regiões metropolitanas de Campinas e Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil”



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

A handwritten signature in blue ink.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas, 2009.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

An43e

Angelini, Michelle

Estudo molecular e comparado de linhagens de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, isoladas de casos de shigelose das regiões metropolitanas de Campinas e Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil / Michelle Angelini. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Shigella sonnei*. 2. *Shigella flexneri*. 3. Shigelose. 4. Técnicas de diagnóstico molecular. I. Silveira, Wanderley Dias da, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Molecular and comparative study of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* strains, isolated from shigellosis in Campinas and Ribeirão Preto metropolitan areas, São Paulo, Brazil.

Palavras-chave em inglês: *Shigella sonnei*; *Shigella flexneri*; Shigellosis; Molecular diagnostic techniques.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Wanderley Dias da Silveira, Marcelo Brocchi, Eliana Guedes Stehling, Mario Paulo Amante Penatti, Tatiana Amabile de Campos.

Data da defesa: 01/06/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 01 de junho de 2009.

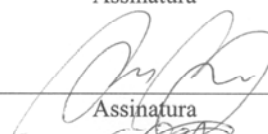
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira. (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



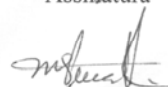
Assinatura

Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling



Assinatura

Prof. Dr. Mario Paulo Amante Penatti



Assinatura

Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhã Costa

Assinatura

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia e no Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização, nos foi concedida bolsa de PED A pela UNICAMP.

A liberdade não nos pode ser dada por ninguém, por nenhuma situação externa a nós ou pela ausência desta. A liberdade é conquistada pela consciência da nossa natureza humana e pela quebra da escravidão mental, fazendo florescer nossa essência verdadeira.

Aos meus pais Eduardo e Graça e aos meus avós Helena e Nelson pela compreensão, apoio, incentivo e pela vida.

Ao Rodrigo pela presença, compreensão, pelo apoio, auxílio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, pelos conhecimentos ensinados, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela participação na banca prévia, pelo apoio durante o desenvolvimento da tese e pela amizade.

À Dra. Eliana Guedes Stehling, pela participação na banca prévia, pelo apoio e ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Mario Paulo Amante Penatti, pela participação na banca examinadora de tese e pelo apoio e companheirismo.

À Dra. Tatiana Amabile de Campos, pela participação na banca examinadora de tese, pelo apoio em vários momentos, auxílio e pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento do trabalho, especialmente ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

À Unicamp, pela concessão da bolsa do Programa PED A e pela oportunidade da experiência docente.

A todos os docentes e funcionários do CESET, em especial à Cassiana e à Ádria pelo auxílio, confiança e pela oportunidade.

À Lurdes e Lúcia, pela atenção e auxílio prestado.

Aos coordenadores de Pós-Graduação, pela forma de condução do curso.

Aos amigos de laboratório Tatiana, Gerson, Mário, Eliana, Marcelo, Fernanda Pace, Fernanda Paganelli, Cris, Vitor, Gisele, Isildinha, Sandra e Ricardo.

Às minhas irmãs Talita e Isabela.

Aos meus amigos e familiares.

Resumo

As bactérias do gênero *Shigella spp.* são responsáveis por infecções intestinais endêmicas e epidêmicas denominadas shigeloses. As shigeloses, transmitidas por via fecal-oral, principalmente através das mãos e água contaminadas, são responsáveis por 10% dos casos de diarreia entre crianças até cinco anos de idade em países em desenvolvimento. Estima-se que, anualmente, 1,1 milhões de pessoas morram de infecções causadas por *Shigella*. No Brasil, estudos revelam que as shigeloses estão entre as principais causas de diarreia. O presente trabalho teve por objetivo analisar a análise clonal comparativa de 119 linhagens de *Shigella spp.*, entre elas 57 *S. flexneri* e 62 *S. sonnei*, isoladas de diferentes casos de shigelose ocorridos nas regiões metropolitanas de Campinas e Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, pelos métodos de PCR da sequência consenso intergênica repetitiva enterobacteriana (ERIC-PCR), de PCR de elementos extragênicos palindrômicos repetitivos (REP-PCR), análise do padrão de macro-restrição em gel de eletroforese com campo pulsado e análise da presença de integrons. A maior parte dos casos de shigelose estudados aconteceram no verão, estação de maior precipitação de chuvas. Do total de casos, 57,9% das infecções causadas por *S. sonnei* e 64,4% das causadas por *S. flexneri* afetaram crianças com menos de 5 anos de idade. Pela análise de ERIC e REP-PCR foram caracterizados grupos de identidade entre as linhagens isoladas em ambas regiões. Pela análise de PFGE caracterizaram-se os genótipos circulantes nas regiões. Não foi possível determinar uma correlação entre a presença dos integrons, o perfil de resistência a antimicrobianos e os resultados obtidos pelos métodos utilizados neste trabalho nas linhagens de *S. sonnei* pesquisadas.

Abstract

The bacteria of the genus *Shigella spp.* are responsible for endemic and epidemic intestinal infections called shigellosis. The shigellosis, transmitted by fecal-oral route, mainly through the hands and contaminated water, are responsible for 10% of cases of diarrhea among children under five years of age in developing countries. It is estimated that annually 1.1 million people die from infections caused by *Shigella*. In Brazil, studies show that shigellosis are among the main causes of diarrhea. The present study was carried out to examine the clonal variation of 119 strains of *Shigella spp.*, including 57 *S. flexneri* and 62 *S. sonnei*, isolated from different cases of shigellosis occurred in the metropolitan regions of Campinas and Ribeirão Preto, São Paulo state, by ERIC-PCR, REP-PCR, and PFGE methods and by integrons profile analysis. Most of shigellosis cases happened in summer, season of highest precipitation of rain. Of the total cases, 57.9% of infections caused by *S. sonnei* and 64.4% of infections caused by *S. flexneri* affected children under 5 years of age. By analysis of ERIC and REP-PCR groups were characterized for identity between the strains isolated in both regions. By the analysis of PFGE circulating genotypes were characterized in the regions. It was not possible to determine a correlation among the presence of integrons, the profile of resistance to antibiotics and the results obtained by the methods used in this work in strains of *S. sonnei* investigated.

Sumário

Lista de tabelas	xiii
Lista de figuras	xiv
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos	28
3.1. Linhagens bacterianas	28
3.2. Meios de Cultura e Soluções	34
3.3. Métodos	38
3.3.1. Condições de Cultivo e Estoque.....	38
3.3.2. Extração de DNA genômico.....	38
3.3.3. Determinação de relação clonal por ERIC e REP-PCR	40
3.3.4. Padrão de restrição em gel de eletroforese com campo pulsado	41
3.3.5. Análise da similaridade genética.	43
3.3.6. Pesquisa de integrons em linhagens de <i>S. sonnei</i>	43
4. Resultados.....	46
4.1. Análise dos casos de shigelose	46
4.2. ERIC e REP-PCR	48
4.3. Padrão de macro restrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	51
4.4. PCR em Tempo Real de linhagens de <i>S. sonnei</i>	66
4.5. Sequenciamento de DNA	74
5. Discussão	75
6. Conclusões.....	83
Referências bibliográficas	85

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. flexneri</i> (CF) isoladas na região metropolitana de Campinas.	29
Tabela 2: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. sonnei</i> (CS) da região metropolitana de Campinas.	30
Tabela 3: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. flexneri</i> (RF) da região metropolitana de Ribeirão Preto.	31
Tabela 4: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. sonnei</i> (RS) da região metropolitana de Ribeirão Preto.	32
Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de ERIC-PCR e REP-PCR.	40
Tabela 6: Lista de iniciadores utilizados para o PCR em Tempo Real.	45
Tabela 7: Distribuição do número de linhagens de <i>S. sonnei</i> e <i>S. flexneri</i> das regiões de Campinas e Ribeirão Preto isoladas nas diferentes estações do ano.	47
Tabela 8: Grupos com 100% de similaridade genética obtidos por ERIC-PCR e REP-PCR.	51
Tabela 9: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. flexneri</i> (CF) isoladas na região metropolitana de Campinas e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.	59
Tabela 10: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. sonnei</i> (CS) isoladas na região metropolitana de Campinas e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.	62
Tabela 11: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. sonnei</i> (RS) isoladas na região metropolitana de Ribeirão Preto e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.	63
Tabela 12: Identificação da amostra, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de <i>S. flexneri</i> (RF) isoladas na região metropolitana de Ribeirão Preto e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.	64
Tabela 13: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade de isolamento, idade do paciente, presença dos integrons (<i>int1</i> , <i>int2</i> e <i>int3</i>), perfil de resistência a antimicrobianos, clones a que pertencem pelos métodos de PFGE e ERIC/REP-PCR e número correspondente às 25 linhagens de <i>S. sonnei</i> nos géis de agarose das figuras (9, 11 e 13).	73

Lista de figuras

- Figura 1: Mapa do estado de São Paulo indicando as cidades e a localização das regiões metropolitanas de Campinas (a) e Ribeirão Preto (b)..... 33
- Figura 2: Gráfico ilustrando a proporção entre o número de linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri*, em ambas as regiões, isoladas de indivíduos em diversas faixas etárias. ND: idade não definida..... 46
- Figura 3: Distribuição do número de isolamentos de linhagens de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, em ambas as regiões, em relação às estações do ano. 47
- Figura 4: Gel de agarose (1,5%) onde pode ser observado o padrão de amplificação característico dos grupos com 100% de similaridade genética obtidos pelas técnicas de ERIC e REP-PCR: 1 (grupo cs10), 2 (grupo cs11), 3 (grupo cs9), 4 (grupo cf4), 5 (grupo cf4), 6 (grupo cs12), 7 (grupo cs9), 8 (grupo rs6), 9 (grupo rs7), 10 (grupo rs13), 11 (grupo rf3), 12 (grupo rf2), 13 (grupo rf1), 14 (rf1), 15 (rs8), 16 (rs6). Os grupos rf são compostos por linhagens de *S. flexneri* isoladas na região de Ribeirão Preto. Os grupos rs são compostos por linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Ribeirão Preto. O grupo cf é composto por linhagens de *S. flexneri* isoladas na região de Campinas. Os grupos cs são compostos por linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Campinas. 49
- Figura 5: Dendrograma de similaridade obtido a partir da análise dos padrões de amplificação obtidos por ERIC e REP-PCR: grupos rf (linhagens de *S. flexneri* isoladas em Ribeirão Preto), grupo cf (linhagens de *S. flexneri* isoladas em Campinas), grupos rs (linhagens de *S. sonnei* isoladas em Ribeirão Preto), grupos cs (linhagens de *S. sonnei* isoladas em Campinas)..... 50
- Figura 6: Dendrograma de similaridade por PFGE das linhagens de *S. sonnei* isoladas nas regiões metropolitanas de Campinas (CS) e Ribeirão Preto (RS). Além do nome, as linhagens estão identificadas com a abreviação da cidade de isolamento e data. As linhagens da região de Ribeirão Preto são provenientes das cidades: Jardinópolis (JD), Barrinha (BA), Cambirá (CA), Cássia dos Coqueiros (CC), Nuporanga (NU) e Ribeirão Preto (RP). As linhagens da região de Campinas são provenientes das cidades: Campinas (C), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS) e Vinhedo (VIN). 55
- Figura 7: Dendrograma de similaridade por PFGE das linhagens de *S. flexneri* isoladas nas regiões metropolitanas de Campinas (CF) e Ribeirão Preto (RF). Além do nome, as linhagens estão identificadas com a abreviação da cidade de isolamento e data. As linhagens da região de Ribeirão Preto são provenientes das cidades: Cajurú (CJ), Guataparã (GU), Jardinópolis (JD), Pontal (PO), Pitangueiras (PI), Barrinha (BA) e Ribeirão Preto (RP). As linhagens da região de Campinas são provenientes das cidades: São João da Boa Vista (SBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I) e Mogi Guaçu (MG)..... 58
- Figura 8: Resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de *S. sonnei* testadas para o gene *int1*. De cima para baixo: CS4, CS16H, CS12, CS2, CS20, CS5, CS19B, CS17,

CS6, CS16A, CS16D, CS16B, CS19A, CS18, CS16G, CS8, CS11, CS16I, CS1, CS3, CS14, CS16E, CS9, CS7 e CS16C.....	66
Figura 9: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 1. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão arranjadas e numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. Todas as linhagens apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 183 pb, a não ser as linhagens CS7 (9) e CS16C (11).	67
Figura 10: Demonstração do resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de <i>S. sonnei</i> testadas para o gene <i>int2</i> . Da esquerda para direita: CS16H, CS18 CS12, CS2, CS20, CS7, CS16A, CS5, CS19B, CS16C CS17, CS6, CS4 CS16D, CS16B, CS19A, CS16G, CS8, CS11, CS16I, CS1, CS3, CS14, CS16E e CS9.	68
Figura 11: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 2. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão arranjadas e numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. Todas as linhagens apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 207 pb.....	69
Figura 12: Demonstração do resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de <i>S. sonnei</i> testadas para o gene <i>int3</i> . De cima para baixo: CS12, CS2, CS20, CS4, CS9, CS19B, CS17, CS6, CS16H, CS16A, CS8, CS16D, CS19A, CS16G, CS16I, CS1, CS3, CS5, CS14, CS16E, CS7, CS16C , CS18, CS16B e CS11.	70
Figura 13: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 3. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. As linhagens CS2 (4), CS3 (22), CS5 (6), CS6 (12), CS7 (9), CS14 (23), CS16B (14), CS16C (11), CS16E (24), CS19A (15), CS19B (7) e CS20 (5), apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 155 pb e as linhagens CS4 (1), CS16H (2), CS12 (3), CS17 (8), CS16A (10), CS16D (13), CS18 (16), CS16G (17), CS8 (18), CS11 (19), CS16I (20), CS1 (21) e CS9 (25), não apresentaram a amplificação do mesmo fragmento.....	71

1. Introdução

As bactérias do gênero *Shigella spp*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram negativos, não esporulados, não encapsulados, anaeróbios facultativos e imóveis. O gênero é, classicamente, dividido em quatro espécies: *Shigella dysenteriae* (sorogrupo A, constituído de 13 sorotipos), *Shigella flexneri* (sorogrupo B, composto por 15 sorotipos, que podem ser classificados em numerosos subsorotipos), *Shigella boydii* (sorogrupo C, composto por 18 sorotipos) e *Shigella sonnei* (sorogrupo C, constituído por um único sorotipo) (Niyogi, 2005). Esta divisão baseia-se na presença do antígeno polissacarídeo O na membrana externa, e no perfil bioquímico (Jennison e Verma, 2004; Niyogi, 2005). O sorotipo 1 de *S. dysenteriae* é, geralmente, responsável por grandes surtos (WHO, 2005). Os sorotipos de *S. flexneri* estão, geralmente, associados às shigeloses endêmicas, sendo os sorotipos 2a e 1a os mais comuns.

O gênero *Shigella* foi diferenciado da espécie *Escherichia coli* por não fermentar a lactose, por ser imóvel e não produzir gás a partir da fermentação de glicose e outros carboidratos (Pupo *et al.*, 2000). Apesar disso, *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) são muito similares bioquimicamente às *Shiguella* e também causam diarreia ou disenteria (Sansonetti *et al.*, 1983a; Hale, 1991).

Recentes trabalhos baseados em análises genéticas, entre eles, estudos de hibridização de DNA (Hale, 1991), “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE), ribotipagem em combinação com MLEE, seqüenciamento do gene *mdh* e análise da seqüência de genes housekeeping, sugerem que a *Shigella*, na verdade, constitui um grupo dentro do gênero *E. coli*. (Pupo *et al.*, 2000; Lan e Reeves, 2002).

Segundo Parsot (2005) as shigeloses são causadas por *Shigella spp.* e por *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), bactérias que possuem o plasmídio de virulência (pINV) que codifica a entrada e disseminação nas células hospedeiras. Apesar da *Shigella* fazer parte do grupo das *E. coli* elas não possuem fatores de aderência (Ogawa e Sasakawa, 2006).

Historicamente, em 1887, a disenteria bacilar foi, pela primeira vez, diferenciada da disenteria amebiana, mas sendo apenas em 1898, o *Bacillus dysenteriae* isolado e descrito por Kiyoshi Shiga. Shiga trabalhava no Instituto de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Imperial de Tokyo, no Japão, onde, em 1897, uma epidemia de disenteria afetou mais de 91.000 pessoas, atingindo uma mortalidade superior a 20% (Shiga, 1898, em Niyogi, 2005), quando descreveu a produção de fatores tóxicos por esta bactéria e entre eles a toxina shiga (Keusch, 1998). Muitas pesquisas foram realizadas na primeira metade do século passado e, em 1950, no Congresso da Associação Internacional dos Microbiologistas, o *Bacillus dysenteriae* recebeu o nome genérico de *Shigella*, sendo classificada nos seus atuais subgrupos (revisado por Hale, 1991). No início da década de 1980, Sansonetti *et al.* (1981) descobriram que a virulência das bactérias do grupo *Shigella* é dependente da presença de uma família de grandes plasmídios no genoma bacteriano (pWR110) (Sansonetti *et al.*, 1982).

Epidemiologia

Na Ásia (com exceção da China), África e América Latina 4,6 a 6 milhões de crianças com menos de 5 anos, morrem de diarreia todos os anos (revisado por Medeiros *et al.*, 2001). A morbidade das doenças infecciosas associadas à desnutrição é uma das principais causas de atraso no crescimento de crianças (Shamebo *et al.*, 1993).

As shigeloses, endêmicas por todo mundo, são altamente contagiosas e tem como principal reservatório os humanos (Kotloff *et al.*, 1999; Sur *et al.*, 2004). Mundialmente são aproximadamente 164,7 milhões de casos, dos quais 163,2 milhões acontecem em países em desenvolvimento e 1,5 milhões em países industrializados. Estima-se que anualmente 1,1 milhões de pessoas morram de infecções causadas por *Shigella*. Um total de 69 % de todos os episódios e 61 % de todas as mortes atribuídas às shigeloses envolvem crianças menores que 5 anos de idade (Kotloff *et al.*, 1999). Apesar de *Shigella* ser o agente mais comum isolado entre as crianças de até 5 anos com disenteria, a maioria dos episódios de shigeloze não são disentéricos (Kosek *et al.*, 2008).

Em países em desenvolvimento, as shigeloses são disseminadas pelas excretas dos indivíduos infectados, diretamente pela via fecal-oral ou com menor frequência através de comida contaminada, moscas ou água. Condições de super lotação e de suprimento de água inadequadamente protegido contra contaminações, contribuem para a alta incidência de infecções (Hale, 1991).

As infecções por *Shigella* se disseminam rapidamente entre grupos HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivo (WHO, 2003). Entre os homossexuais do sexo masculino o risco de transmissão direta de *Shigella* é alto (Blaser *et al.*, 1989). Contaminações diretamente pela via fecal-oral podem contribuir com as shigeloses endêmicas em ambientes institucionais, como hospitais psiquiátricos, hospitais dia, casas de repouso, prisões e aglomerações ao ar livre (Wharton *et al.*, 1990).

Nos hospitais, as *Shigella* são introduzidas por pacientes ou funcionários infectados ou colonizados pela bactéria. Surtos de infecção em hospitais, hospitais dia e em algumas comunidades são difíceis de controlar por causa da fácil transmissão e da resistência de algumas linhagens a múltiplos antimicrobianos (Lima *et al.*, 1997).

A média de isolamento de *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* e *S. sonnei*, retratada em trabalhos de todo mundo, é respectivamente de 57%, 10%, 8% e 17% (Ram *et al.*, 2008). *S. flexneri* tipo 2a (resistente ao grupo das penicilina, mas não ao grupo das quinolona) é predominante em países em desenvolvimento, sendo responsável por 60% das infecções, seguido dos sorotipos 1b, 3a, 4a e 6 (Kotloff *et al.*, 1999; WHO, 2003). *S. dysenteriae* tipo I é a única causa das epidemias de disenteria, com 5 a 15% dos casos resultando em morte (WHO, 2003). Em países desenvolvidos, os surtos, que geralmente envolvem *S. sonnei*, ocorrem esporadicamente e têm normalmente como fonte comida mal cozida e saladas que contém carboidratos ou proteínas (Black *et al.*, 1978).

As shigeloses endêmicas e epidêmicas são um problema por todo mundo. O fato de algumas linhagens desenvolverem resistência a múltiplos antimicrobianos é um problema que tem crescido juntamente com a preocupação das autoridades responsáveis por garantir a saúde de determinadas populações.

Em um trabalho, desenvolvido por Okeke e Edelman (2001), foi demonstrado que muitas das linhagens resistentes a antimicrobianos isoladas nos países desenvolvidos são provenientes de nações em desenvolvimento ou subdesenvolvidas. Estas linhagens são carregadas de diferentes formas, por viajantes, animais, pessoas que trabalham com transporte e imigrantes. A economia brasileira vem apresentando um grande crescimento, atraindo pessoas de outros países, inclusive imigrantes de outros países em desenvolvimento. Esta é uma situação em potencial para disseminação de resistência a antimicrobianos entre a população microbiana local. A redução das pressões seletivas e uma vigilância intensa são as duas medidas mais efetivas no controle da disseminação dos genes de resistência (Okeke e Edelman 2001).

Na América Latina a diarreia bacteriana, viral ou de outra causa, tem sido uma importante causa de mortalidade e morbidade na infância, sendo responsável por aproximadamente 10% das mortes (Sobel *et al.*, 2004). Um estudo realizado no Chile revelou que nos primeiros cinco anos de vida, as crianças têm 67% de chance de contrair shigeloses (Ferreccio *et al.*, 1991). No ano de 2002, dos 967 soldados de uma base militar na Amazônia peruana, 307 apresentaram diarreia aguda, dos quais *Shigella spp.* foi o principal patógeno isolado (40%). Das *Shigella* isoladas, que apresentavam resistência aos antimicrobianos comumente prescritos na região, 90% correspondiam a *S. flexneri* (Jones *et al.*, 2004).

No Brasil alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de analisar a incidência das shigeloses e de caracterizar as linhagens isoladas (Lima *et al.*, 1997; Medeiros *et al.*, 2001; Sobel *et al.*, 2004; Diniz-Santos *et al.*, 2005; Peirano *et al.*, 2006; Maranhão *et al.*, 2008). Em um recente estudo que pesquisou características das diarreias agudas no nordeste do Brasil, *Shigella* foi responsáveis por 11,6% dos casos (Maranhão *et al.*, 2008). Em um trabalho com crianças de Salvador-BA que apresentavam diarreia aguda foi demonstrado que mais da metade dos casos foram causados por *Shigella spp.*, reforçando a importância deste patógeno na epidemiologia das diarreias bacterianas na infância. Neste trabalho, a maior parte dos pacientes com shigelose necessitaram de hospitalização imediata (Diniz-Santos *et al.*, 2005).

Em um estudo do Programa Brasileiro de Vigilância da *Shigella* (Oswaldo Cruz-Fiocruz), das 296 linhagens de *Shigella* isoladas de diferentes regiões do Brasil, 53% correspondem a *S. flexneri* e 44% correspondem a *S. sonnei*. É interessante observar que na região Nordeste foram isoladas predominantemente linhagens de *S. flexneri*, enquanto que na região sudeste foram isoladas predominantemente linhagens de *S. sonnei*. Talvez este

fato se deva às diferenças sócio-econômicas observadas entre estas duas regiões (Peirano *et al.*, 2006). Na cidade de São Paulo um estudo revelou que as shigeloses correspondem a 16% entre os casos de diarreia em crianças, das quais 9% foram causadas por *S. flexneri* e 6% por *S. sonnei* (Sobel *et al.*, 2004). Em um estudo que caracterizou os principais enteropatógenos causadores de diarreia na região de Ribeirão Preto, onde foram analisadas 1836 amostras de fezes, *Shigella* revelou ser o segundo mais freqüente agente etiológico isolado de crianças com menos de 2 anos de idade (Medeiros *et al.*, 2001).

Lima *et al.* (1997) analisaram o padrão de resistência a antimicrobianos, o perfil plasmidial e perfil de macro-restrição em gel de eletroforese com campo pulsado (PFGE) de 25 linhagens de *Shigella flexneri* isoladas na comunidade e em hospitais, na região da cidade de Fortaleza no nordeste do Brasil, onde as shigeloses são endêmicas, entre 1988 e 1993. Seus resultados demonstraram que vários perfis plasmidiais e padrões de resistência a antimicrobianos circulam no “pool” de *S. flexneri*. Os resultados de PFGE indicaram a predominância de alguns grupos de linhagens, além disso, a ocorrência de muitos surtos pode estar oculta naquele ambiente (Lima *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos, tendo como objeto as diarreias infecciosas, têm sido feitos no Brasil (Moreno *et al.*, 2008) e no estado de São Paulo (Sobel *et al.*, 2004), apesar disso poucos deles (Lima *et al.*, 1997; Penatti *et al.*, 2007) pesquisaram a correlação genética entre estas linhagens de *Shigella* e se existem populações que circulam predominantemente, em detrimento de outras e suas correlações.

O fato de as shigeloses não serem uma doença de notificação compulsória no Brasil, torna difícil estimar sua real taxa de incidência (Peirano *et al.*, 2006).

Estratégias de controle

As principais vias de transmissão da shigelose são através da ingestão de água e de alimentos contaminados e do contato pessoa a pessoa. Desta forma, as estratégias de controle e prevenção incluem essencialmente a provisão de água tratada, condições sanitárias adequadas, boa higiene pessoal e comida saudável. Recomenda-se que a água deva ser clorada e bem armazenada, e os esgotos descartados adequadamente. A lavagem das mãos com sabão e água é a medida isolada mais efetiva para prevenir a transmissão de *Shigella*. As mãos devem ser lavadas depois de defecar, depois da limpeza de uma criança que tenha defecado, depois de dispensar as excretas das crianças, antes de preparar ou manusear alimentos e antes de comer (Sur *et al.*, 2004). Educação é a chave para a conscientização e cooperação pública (WHO, 1994).

A amamentação também deve ser promovida, uma vez que foi observado que bebês e crianças que foram amamentados apresentaram menos episódios de diarreia e disenteria causados por *Shigella*, e que quando estes ocorreram foram menos severos. A proteção é maior quando as crianças são exclusivamente amamentadas até os 4 a 6 meses de idade (WHO, 1994). Trabalhos realizados no nordeste do Brasil têm ressaltado a importância do aleitamento materno como um fator protetor contra a ocorrência de diarreias e shigelose (Araújo *et al.*, 2005; Maranhão *et al.*, 2008).

A doença

A shigelose, ou disenteria bacilar aguda, é uma infecção invasiva, cujas manifestações clínicas iniciam-se após 24-48 horas, podendo demorar dias, desde a ingestão de algumas centenas, ou milhares de bactérias. Os principais sintomas são febre, fadiga, mal estar e anorexia, diarreia e outras ocorrências, como um pequeno volume de

sangue nas fezes, evacuação mucóide, cólicas abdominais e tenesmo (sentimento de evacuação incompleta acompanhada de dor retal) (DuPont *et al.*, 1969; Mathan e Mathan, 1991; Sur *et al.*, 2004). Esta infecção é causada pela invasão do epitélio do cólon e reto de primatas e humanos pelo microrganismo e pode compreender variadas manifestações clínicas, desde uma diarreia aquosa de curta duração, até uma doença inflamatória grave do intestino. As diferentes fases da infecção e suas manifestações dependem da espécie infectante, da idade do hospedeiro, da presença de fatores de risco e da situação imunológica do hospedeiro (Levine *et al.*, 1973; Bennish, 1991; Niyogi, 2005). A diarreia aquosa geralmente precede a disenteria (DuPont *et al.*, 1969), que pode ser branda, moderada ou muito intensa (Sur *et al.*, 2004). Em infecções brandas a shigelose pode ser assintomática, ou pode ter a diarreia como única manifestação (Taylor *et al.*, 1986; Sur *et al.*, 2004). Em pacientes com disenteria, o envolvimento é mais severo no cólon distal, e a colite inflamatória resultante é evidenciada em freqüentes defecações com fezes escassas que refletem o fluxo de fluido ileocecal. Pacientes com infecção severa podem passar por mais de 20 evacuações por dia (Mathan e Mathan, 1991). Em alguns casos, as shigeloses levam a sintomas neurológicos como a letargia, confusão mental, forte dor de cabeça e convulsões (Ashkenazi *et al.*, 1987; Ashkenazi *et al.*, 1990). Enquanto as infecções por *S. sonnei* produzem, normalmente, uma disenteria branda, as causadas por *S. flexneri* e *S. dysenteriae* normalmente resultam em uma disenteria severa e, particularmente, demorada (Sur *et al.*, 2004).

A disenteria também é caracterizada por uma perda diária de 200 a 300 mL de proteínas do soro nas fezes, resultando em uma baixa nos estoques de nitrogênio que agrava a desnutrição e os problemas de crescimento. A diminuição de fatores imunológicos também aumenta o risco de infecções oportunistas e pode contribuir para a mortalidade

(Niyogi, 2005). Principalmente nos estágios iniciais da doença, o indivíduo pode apresentar anorexia, o que contribui para a deterioração do estado nutricional (Butler *et al.*, 1986).

A maior parte dos episódios de shigelose, em indivíduos saudáveis, são auto limitados e se resolvem em 5 a 7 dias sem seqüelas. Complicações agudas sérias são mais observadas entre crianças mal nutridas ou entre crianças muito novas em países em desenvolvimento (Bennish, 1991). Entre estas complicações estão os desarranjos metabólicos como desidratação, hiponatremia (baixa concentração de sódio no sangue) e hipoglicemia); complicações intestinais (como megacólon tóxico, prolapso retal, perfuração intestinal e hemorragia); encefalopatia, pneumonia (Bennish, 1991) e, mais raramente, septicemia (Struelens *et al.*, 1985). As seqüelas crônicas mais comuns são diarréia persistente e o desenvolvimento de desnutrição (Black *et al.*, 1982; Sur *et al.*, 2004).

A reação leucemóide e a síndrome urêmica hemolítica (anemia microangiopática hemolítica, trombocitopenia e acometimento renal) também podem ser observadas em infecções por *S. dysenteriae* tipo 1 e podem ser fatais (Sinha *et al.*, 1987). Muitos pacientes também relatam dores nas articulações (Sur *et al.*, 2004). Uma rara complicação, pós-infecção, observada em adultos acometidos por *S. flexneri* é a artrite inflamatória reativa (Sieper *et al.*, 1993) que, quando ocorre acompanhada de conjuntivite e uretrite, é conhecida como síndrome de Reiter (Finch *et al.*, 1986). Complicações intestinais e extraintestinais das shigeloses podem levar à morte (Bennish, 1991), principalmente em infecções por *S. dysenteriae* tipo 1 (Sur *et al.*, 2004).

O diagnóstico da shigelose pode ser feito clinicamente pelas características físicas da doença mas, algumas vezes, é necessária a confirmação laboratorial através de cultura de fezes e da determinação do padrão de resistência a antimicrobianos (Sur *et al.*, 2004). Em muitos países em desenvolvimento, o acesso a exames laboratoriais nem sempre é fácil o

que pode dificultar o diagnóstico e retardar o tratamento (Lima *et al.*, 1995). O exame microscópico de esfregaço fecal corado com iodo pode revelar a presença abundante de leucócitos, podendo a confirmação ser feita pela coprocultura, testes sorológicos e bioquímicos (Sur *et al.*, 2004).

Apesar de, raramente ser observada grande perda de fluidos e desidratação severa (Butler *et al.*, 1986), na ocorrência destes sintomas ou de evacuações líquidas, o paciente deve receber reidratação salina por via oral, de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde/ UNICEF. No caso de uma desidratação mais grave, é recomendada a administração intravenosa de solução de Ringier (Sur *et al.*, 2004).

Em um recente trabalho realizado no nordeste brasileiro, foi observada a recuperação do peso e do status nutricional de indivíduos que apresentavam diarreia aguda, após 30 dias de tratamento de reidratação exclusivamente (Maranhão *et al.*, 2008).

O uso de antimicrobianos pode desempenhar um importante papel no controle das shigeloses, acelerando a recuperação, diminuindo a duração da excreção de patógenos nas fezes e prevenindo complicações. Para isso, o antimicrobiano deve ser cuidadosamente escolhido, levando em consideração o padrão de sensibilidade das linhagens circulantes (Sur *et al.*, 2004). O uso indiscriminado de antimicrobianos e a transferência horizontal de genes têm levado à resistência bacteriana aos antimicrobianos comumente usados (Peirano *et al.*, 2006), tornando necessária a busca de novas opções de antimicrobianos, muitas vezes mais caros (Kotloff *et al.*, 1999; Ashkenazi *et al.*, 2003). Por este motivo, em países em desenvolvimento, onde a ocorrência de diarreia é alta devido a fatores socioeconômicos e ambientais, a eficiência dos tratamentos com os antimicrobianos mais amplamente usados e baratos (ampicilina, ácido nalidíxico, cotrimoxazol, tetraciclina e cloranfenicol) tem

decaído, sendo as quinolonas (norfloxacin e ciprofloxacina) um dos poucos grupos de antimicrobianos ainda efetivos (Kotloff *et al.*, 1999; Sack *et al.*, 2001).

Para redução da mortalidade pelas shigeloses é necessário que se foque em medidas preventivas e, neste sentido, a Organização Mundial de Saúde tem priorizado o desenvolvimento de vacinas (Kotloff *et al.*, 1999; Ashkenazi *et al.*, 2003).

Um grande número de vacinas está em desenvolvimento mas, provavelmente, as formulações orais são as mais indicadas para os países em desenvolvimento (Ram *et al.*, 2008). Entre as vacinas em desenvolvimento que tem como alvo *S. flexneri* 2a, estão quatro vacinas usando formulação oral (SC 602, CVC 1203, CVC 1204, CVC1208) e uma usando a via parenteral (LPS de *S. flexneri* conjugado a uma exoproteína A recombinante de *Pseudomonas*). Outra vacina oral (WRSS1) e uma parenteral (LPS de *S. sonnei* conjugado a uma exoproteína A recombinante de *Pseudomonas*), tem como alvo *S. sonnei* (Nataro, 2004).

Na América Latina, vários estudos foram feitos com o objetivo de fornecer dados para o desenvolvimento de vacinas, estimando o impacto (Kosek *et al.*, 2008) e identificando possíveis grupos de pessoas nos quais estas vacinas poderiam ser testadas (Jones *et al.*, 2004). Em um estudo, Kosek *et al.* (2008) concluíram que seria necessária uma vacina multivalente para se obter eficiência no controle das shigeloses, devido à diversidade de sorotipos encontrada.

Genética da virulência de *Shigella*

A maior parte dos genes de virulência de *Shigella* estão localizados em um plasmídio de alto peso molecular, chamado “plasmídio de virulência” (pINV), com aproximadamente 220 kb. Estes genes localizam-se, mais precisamente, em um fragmento

de 31kb, que codifica sua capacidade de invasão (Sansonetti *et al.*, 1981). Essa sequência, conhecida como “região de invasão”, é composta por dois loci gênicos distintos que codificam proteínas associadas à capacidade de invasão, tendo a função de induzir uma reestruturação do citoesqueleto celular eucariótico na região de contato com a célula bacteriana (Maurelli *et al.*, 1984; Maurelli *et al.*, 1985; Sasakawa *et al.*, 1988). Um dos loci é composto pelo operon *ipa*, com os genes que codificam proteínas responsáveis pela invasão (Sasakawa *et al.*, 1989). As proteínas Ipa, mediadoras da macropinocitose e outros eventos relacionados à virulência de *Shigella*, têm sua síntese termorregulada, com repressão abaixo de 30° C (Buysse *et al.*, 1987).

O cromossomo de *Shigella spp.* apresenta, aproximadamente, 4.600.000 pares de bases (Wei *et al.*, 2003), no qual foram indentificadas três ilhas de patogenicidade, codificando importantes fatores de virulência, como lipopolissacarídeo e reguladores da expressão de genes de virulência presentes no “plasmídio de virulência” (Sansonetti *et al.*, 1982; Sansonetti *et al.*, 1983b; Rajakumar *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2001; Walker e Verna, 2002).

Em experimentos, realizados por Sansonetti *et al.* (1982), a perda do plasmídio de virulência pWR110 levou à perda da capacidade de invasão, mensurada *in vitro* pela perda da capacidade de infecção em células de mamíferos, e de causar ceratoconjuntivite no teste de Sereny. O fenótipo de invasão foi restabelecido pela reintrodução do plasmídio de virulência nestas linhagens (Sansonetti *et al.*, 1982).

Recentes estudos descreveram um mecanismo de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos, a transferência horizontal de *integrons*, comum a muitos membros da família *Enterobacteriaceae*, que pode ser responsável por linhagens multirresistentes (Oh *et al.*, 2003; Ranjbar *et al.*, 2007). Os *Integrons* têm a capacidade de

integrar múltiplas cópias de genes de resistência a drogas em sítios específicos do DNA, sem interromper a função original do DNA (Ploy *et al.*, 2000; Alekshun e Levy, 2007). Existem 5 classes diferentes de integrons identificadas (Peirano *et al.*, 2005) e, entre estas, o Integron 1 (Int 1), Integron 2 (Int 2) e Integron 3 (Int 3) têm sido os mais estudados e descritos na literatura (Ploy *et al.*, 2000). Cada classe de integron é caracterizada pela presença de um gene integrase específico, que fica em associação com o gene cassete que codifica a resistência a drogas (Peirano *et al.*, 2005).

Int 1 é o integron mais comumente associado a bactérias gram negativas e, normalmente, confere resistência a compostos quaternário de amônio ou sulfonamidas (Petersen *et al.*, 2000). Em geral um integron é composto por um segmento final 5' e 3' conservados nas extremidades e de uma região central variável (Ploy *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2008), que contém diferentes genes cassetes (Kim *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2008).

O final 5' é semelhante em todos os integrons e contém um gene integrase (int1), que é sítio específico, um sítio de integração (att1) e um promotor P (Ploy *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2008). Os integrons fornecem uma sequência promotora comum aos genes cassete, facilitando a sua integração ao DNA (Kim *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2008). A região promotora tem dois promotores chamados P1 e P2. O promotor P1 pode ser de quatro tipos: um promotor fraco, um promotor forte ou dois promotores híbridos. O promotor P2 pode ser de dois tipos: um promotor ativo e um promotor inativo (Hall e Collis, 1995; Schmitz *et al.*, 2001). A potência de diferentes promotores pode ser estimada pela comparação com o promotor *tac* de *E. coli*. Hall e Collis (1995) demonstraram que o promotor *tac* é seis vezes menos potente que o tipo “forte” de P1 mas, apesar disso, o promotor *tac* é significativamente mais eficiente quando comparado com o tipo “fraco” de

P1 e quando os tipos “forte” de P1 e “fraco” de P1 são usados em combinação, a transcrição ocorre com uma eficiência três vezes maior do que ocorreria com o promotor *tac* (Hall e Collis, 1995).

Patogenia

Os estudos *in vivo* dos mecanismos de patogenicidade de *Shigella* têm sido prejudicados pela falta de modelos animais, já que estas bactérias só são capazes de estabelecer a doença em humanos e primatas. Apesar disso, recentes modelos de estudo da doença em ratos neonatos (Fernandez *et al.*, 2003), testando a infecção acompanhada da injeção de interleucina-8 dentro do lume intestinal (Singer e Sansonetti, 2004), o uso do invertebrado *Caenorhabditis elegans* (Burton *et al.*, 2006), entre outros, têm se mostrado promissores para o estudo de fatores do hospedeiro envolvidos nas shigeloses.

Depois de ingeridas, as células de *Shigella* atravessam o estômago e se proliferam no intestino delgado, mas é no intestino grosso que vão causar as lesões características das shigeloses. Em condições experimentais, a ingestão de poucas dezenas de células bacterianas foi capaz de causar doença em 10% dos voluntários e a ingestão de 500 organismos foi capaz de causar doença em 50% dos casos (DuPont *et al.*, 1989). A resistência a pHs ácidos extremos como o do estômago, permite que *Shigella* sobreviva, mesmo quando apenas um pequeno número de células é ingerido, tornando possível a infecção da mucosa intestinal. Small *et al.* (1994) demonstraram que o gene *rpoS* é responsável pela resistência da *Shigella* ao pH do estômago. No intestino grosso as bactérias podem romper a barreira epitelial através dos enterócitos ou das células M, que são células especializadas do epitélio sobre os folículos linfóides da mucosa e, depois disso,

invadem as células epiteliais, causando intensa reação inflamatória que leva à destruição da mucosa e a uma intensa diarreia, com a presença de sangue e muco (Ogawa *et al.*, 2005).

Além de penetrar nas células da mucosa, *Shigella* é capaz de se disseminar entre as células vizinhas. A infecção fica geralmente confinada à camada superficial da mucosa do cólon, onde os danos teciduais levam a abscessos e ulcerações (Bennish, 1991).

Depois de invadir o epitélio através das células M, as bactérias são fagocitadas por macrófagos, dentro dos quais ela escapa do fagossomo para o citoplasma, onde se multiplica e induz rapidamente à morte celular macrofágica, depois de 1 a 2 horas de infecção. A *Shigella* pode induzir os macrófagos à morte por dois caminhos distintos: ativação da caspase-1 pela proteína IpaB, a qual leva à maturação e liberação de IL-1 β (Navare e Zychlinsky, 2000) ou pela translocação do lipídeo A bacteriano para o citoplasma do macrófago (Suzuki *et al.*, 2005).

As células de *Shigella* liberadas dos macrófagos mortos são internalizadas pelos enterócitos vizinhos através da sua superfície basolateral, por um processo de indução à fagocitose. Dentro dos enterócitos elas são envolvidas pela membrana de um vacúolo fagocítico, a qual posteriormente se rompe, possibilitando que as bactérias escapem para o citoplasma celular. Livre no citoplasma, a bactéria se replica e se move direcionada pelo ponto onde ocorre a polimerização da actina em um de seus pólos (Cossart e Sansonetti, 2004; Gouin *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2005). A bactéria induz a formação de protrusões na membrana da célula hospedeira, pressionando a célula adjacente, através das quais, após a lise, as células vizinhas serão posteriormente infectadas (Cossart e Sansonetti, 2004; Gouin *et al.*, 2005). Desta forma, a infecção dos macrófagos por *Shigella* leva a uma inflamação do tecido intestinal, que é agravada pela infecção das células epiteliais, fato essencial para a virulência de *Shigella*.

Dentro da célula epitelial, a bactéria se replica e libera peptídeoglicano no compartimento intracelular, que é reconhecido por CARD 4 (Bertin *et al.*, 1999) ou Nod1 (Inohara *et al.*, 1999). CARD 4 é uma molécula associada ao reconhecimento de patógenos no citoplasma que, quando sobre-expressa, é capaz de ativar NF-kB (fator nuclear kB) que, por sua vez, leva à produção da citocina pró-inflamatória IL-8 (Philpote *et al.*, 2000; Girardin *et al.*, 2001). Desta forma, CARD4 é capaz de detectar a presença de LPS intracelular, levar à formação do complexo IKK-RICK e induzir a uma resposta imune inata, mediada pela ativação de NF-kB e JNK (Kinase c-Jun N-terminal) (Girardin *et al.*, 2001). Pesquisas demonstraram que a microinjeção de LPS diretamente dentro das células epiteliais leva à ativação de NF-kB (Girardin *et al.*, 2001).

Outro sistema de vigilância inato, que monitora invasores citoplasmáticos, é o caminho autofágico, que identifica patógenos, os envolve em uma membrana autofágica e, finalmente, os entrega a um compartimento lítico, onde são degradados por autolisossomos (Kirkegaard *et al.*, 2004).

Desta forma, a invasão das células epiteliais leva à produção de quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas como IL-8, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que induzem a infiltração de neutrófilos no tecido intestinal. A migração de neutrófilos exacerba a infecção, pois rompe a firme junção epitelial durante seu movimento em direção ao lúmen, permitindo às outras células de *Shigella*, acesso à superfície basolateral dos enterócitos.

Apesar de alguns sintomas clínicos da shigelose serem uma consequência direta da ação das citocinas, as mesmas são essenciais para conter e controlar a infecção (Jennison e Verma, 2004). A inflamação intestinal grave, gerada pela shigelose pode persistir por mais de um mês, com uma regulação aumentada de várias citocinas como, IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ , TNF- β , IL-4, IL-10, TGF- β e IL-8 (Raqib *et al.*, 1995).

Inicialmente, a inflamação resultante no epitélio intestinal parece beneficiar a bactéria *Shigella*, pois favorece a infecção e replicação dentro do hospedeiro, mas o recrutamento de um grande número de neutrófilos ativados termina por levar à resolução da infecção, pelo fato de serem eficientes matadores de *Shigella* (Navare e Zychlinsky, 2000; Brinkmann *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2006). Neste aspecto, *Shigella* parece ter mecanismos para modular ou otimizar a resposta inflamatória em seu benefício, facilitando a colonização dos tecidos do hospedeiro. Estudos recentes revelam que a proteína IpaH9.8 de *Shigella*, secretada para o citoplasma celular, é capaz de regular a ativação de NF- κ B e de se acumular no núcleo da célula onde interage com U2AF³⁵, que é um fator de repressão global da expressão de genes, incluindo genes relacionados à produção de citocinas e quimiocinas (Haraga e Miller, 2003; Okuda *et al.*, 2005). Em um modelo murino de infecção, uma linhagem mutante ipaH9.8 causou uma resposta inflamatória mais severa, com um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, em relação ao tipo selvagem. IpaH9.8 tem uma afinidade específica por U2AF³⁵ e a redução dos níveis deste fator de ligação de mamíferos em células HeLa, levou a um decréscimo na expressão dos genes responsáveis pela expressão de IL-8, RANTES, GM-CSF e IL-1 β , conforme mensurado pelo método de RT-PCR (Okuda *et al.*, 2005).

Proteínas efetoras bacterianas modulam várias funções do hospedeiro, como o escape do sistema de defesa inato, e remodelam a arquitetura da superfície da célula hospedeira (Tran Van Nhieu *et al.*, 2000). Dorman (1995) verificou que as proteínas Ipa são secretadas somente depois que a *Shigella* é ingerida, já que os genes responsáveis por essas proteínas só são expressos a 37 °C.

A atividade do mecanismo Mxi-Spa é responsável pelo processo de entrada da bactéria na célula, que compreende a secreção de várias proteínas bacterianas, iniciada pelo

contato da bactéria com a célula do hospedeiro. Entre estas proteínas, estão as Ipa que induzem a um rearranjo do citoesqueleto do hospedeiro (MeÂnard *et al.*, 1994a; Watarai *et al.*, 1995). O mecanismo preciso pelo qual a bactéria alcança o citoplasma, depois de entrar em contato com a célula epitelial, ainda não está totalmente definido; sabe-se que proteínas efetoras IpaA (78kDa), IpaB (57 kDa), IpaC (43kDa), IpaD (39kDa), IpgD, IpgB1 e VirA são injetadas, por uma maquinaria de secreção tipo III, dentro e sobre a membrana da célula epitelial, formando um poro e disparando a resposta celular (Sansonetti, 1999; Skoudy *et al.*, 2000). No meio extracelular o complexo solúvel Ipa B-C, formado no meio externo, está envolvido em diferentes passos no processo de entrada de *Shigella*, entre eles, o reconhecimento de receptores celulares e na formação do poro (MeÂnard *et al.*, 1994b; Watarai *et al.*, 1995; Skoudy *et al.*, 2000).

A associação do complexo IpaB-C-D com a integrina $\alpha 5\beta 1$ foi proposta como um possível mecanismo pra induzir a entrada de *Shigella*, depois de sinalizar via integrina $\beta 1$ (Watarai *et al.*, 1996). Apesar disso, o papel dos efetores de entrada de *Shigella* nos receptores de superfície celular, como as integrinas $\beta 1$, ainda não foi totalmente esclarecido. O que se sabe é que o complexo IpaB-C é inserido na membrana celular o que, possivelmente, possibilita a entrada de outros efetores de *Shigella* como Ipa A (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997).

A entrada de *Shigella* na célula epitelial é caracterizada por uma reorganização transitória do citoesqueleto da célula hospedeira no sítio de interação com a bactéria, formando projeções na membrana que se desenvolvem e se juntam sobre o corpo bacteriano, permitindo sua internalização em um processo macropinocítico (Clerc e Sansonetti, 1987; Skoudy *et al.*, 2000).

Ipa B interage com o receptor hialurônico CD44, o que possibilita uma mobilização do receptor em micro domínios ricos em colesterol e leva a um rápido recrutamento de moléculas de sinalização no sítio de entrada da bactéria (Lafont *et al.*, 2002). Desta forma, IpaB se liga diretamente ao domínio extracelular de CD44 de uma maneira saturável e reversível e, provavelmente, facilita a translocação (entrada) de outras proteínas Ipa. Esta ligação é confirmada pelo efeito inibitório de anticorpos anti CD44 e pela taxa de entrada de *Shigella* em células que expressam CD44 em comparação com outras deficientes deste receptor (Skoudy *et al.*, 2000). IpaB também está envolvida na lise do vacúolo após internalização de *Shigella* (High *et al.*, 1992) e na apoptose de macrófagos (Chen *et al.*, 1996).

É interessante notar que tanto o CD44 quanto a integrina $\beta 1$ estão localizados basolateralmente na célula, e a associação de IpaB com estes receptores explicaria a polaridade do processo de entrada de *Shigella* (Mounier *et al.*, 1992; Sheikh e Isacke, 1996).

IpaB-CD44 promovem a invasão por *Shigella* através do acúmulo de c-Scr e pela estimulação da fosforilação da cortactina e Crk pela Abl tirosina kinase (Lafont *et al.*, 2002; Burton *et al.*, 2003) que, em mamíferos, tem sua função relacionada com a regulação da proliferação celular, sobrevivência, adesão e migração (Pendergast, 2002). Burton *et al.* (2003) demonstraram que a família Abl de tirosina kinases e Crk se acumulam no sítio de entrada da bactéria e propuseram um padrão de sinalização disparado pela infecção bacteriana que leva à ativação catalítica de Abl e Arg tirosina kinases, à fosforilação do Crk e ativação da família de GTPases Rho, CD42 e Rac.

Ipa C é capaz de induzir a polimerização da actina diretamente ou por uma via dependente da ativação do CD42 e, subsequente, de Rac1, mas este mecanismo ainda

não está totalmente claro (Kuelto *et al.*, 2003; Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). Experimentos têm demonstrado que a polimerização da actina, que leva à formação das extensões celulares (filopodia) no sítio de contato entre a célula e a bactéria, depende do acesso da proteína IpaC ao citosol celular (Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). O fato de *S. flexneri* ter perdido sua capacidade de invadir, depois de ter sido mutada em IpaC (Ménard *et al.*, 1993), não significa que esta proteína é importante apenas no processo de internalização, agindo unicamente através do mecanismo acima descrito, já que ela também demonstra agir como parte do sistema de secreção tipo III, na formação de um poro na membrana da célula hospedeira, juntamente com IpaB (Blocker *et al.*, 1999), podendo, neste caso, limitar a chegada de todas as outras proteínas efetoras.

Outro efector do tipo III de *Shigella*, o VirA, se liga a hetero-oligômeros de tubulina e inibe a formação de microtúbulos (o que favorece a polimerização da actina) e promove sua degradação, gerando perturbações e protrusões Rac dependentes na membrana. VirA, assim como Abl/Arg tirosina kinases, pode causar a ativação do GEF (guanine nucleotide Exchange factor – fator de troca do nucleotídeo guanina) resultando na ativação de Cdc42 e Rac GTPase (Skoudy *et al.*, 2000). Resultados obtidos por Uchiya *et al.* (1995) sugerem que o papel de VirA na invasão é dependente das Ipa, atuando como uma proteína efetora que modula as funções do hospedeiro durante a invasão por *Shigella*. Não está totalmente claro se VirA e IpaC desempenham mutuamente o papel de induzir ondulações e projeções da membrana durante a entrada da bactéria ou se agem separadamente, induzindo Rac1 por caminhos distintos. De qualquer forma, a atividade de ambas é necessária para que *Shigella* invada de forma eficiente as células epiteliais (Yoshida *et al.*, 2002).

Ipa A se liga à vinculina, um componente da adesão focal, e o complexo IpaA-vinculina junto com a F-actina promovem a despolimerização dos filamentos de actina,

necessária para que ocorram as modificações da membrana induzidas por *Shigella*. IpaA associada à vinculina leva ao recrutamento de outras proteínas do citoesqueleto como a α -actinina para organizar a formação das estruturas de entrada celular e também para a formação de uma adesão pseudo-focal justapondo a membrana à bactéria. IpaA é necessária então para transformar as extensões celulares induzidas por *Shigella* em estruturas que permitam sua entrada e o seu englobamento dentro da bolsa macropinocítica (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997; Tran Van Nhieu *et al.*, 1999; Bourdet-Sicard *et al.*, 1999).

IpgB1, também secretada via sistema de secreção tipo III, desempenha um importante papel induzindo a formação de projeções na membrana (*ruffles*) das células epiteliais através da estimulação de Rac1 e ativação de Cdc42 e, conseqüentemente, ativação de Rho GTPases (Ohya *et al.*, 2005). Ohya *et al.* (2005), trabalhando com linhagens ipgB1 mutantes observaram um decréscimo de 50% na capacidade de invadir em relação aos tipos selvagens.

IpgD, também translocado para dentro da célula epitelial, age como um potente inositol 4-fosfatase que gera uma desfosforilação, transformando $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em $\text{PtdIns}(5)\text{P}$. Isto leva à remodelação dos filamentos de actina e a mudanças morfológicas na célula hospedeira, com a formação das protrusões na membrana (*ruffles*) (Niebuhr *et al.*, 2002).

O processo de entrada de *Shigella* nas células epiteliais não fagocíticas é um processo com muitas etapas envolvendo sinergismo de vários efetores bacterianos e respostas celulares, que leva à formação de grandes extensões da membrana que terminam por envolver a bactéria em um vacúolo macropinocítico (Gouin *et al.*, 2005).

Depois da internalização, *Shigella* escapa do vacúolo e começa a se deslocar a 10-15 $\mu\text{m}/\text{min}$. Bernardini *et al.* (1989) demonstraram que *icsA* é um locus no plasmídio de

virulência pWR100 de *S. flexneri* responsável por sua disseminação. A polimerização da actina é mediada pela proteína bacteriana IcsA (130kDa) (ou VirG), que é a única proteína bacteriana necessária para este processo. IcsA está localizada na membrana externa de forma polarizada, que se acumula em alta concentração no pólo a partir do qual a actina se polimeriza e se liga às NPFs (fator protéico que promove a nucleação) (no hospedeiro N-WASP), de onde se inicia a polimerização da actina. IcsA parece funcionar como Cdc42 que promove alterações conformacionais, que ativam N-WASP, e subseqüentemente, o complexo Arp2/3, que polimeriza os filamentos de actina (Gouin *et al.*, 2005). Os níveis de IcsA são regulados a nível transcricional pela proteína VirF (Lett *et al.*, 1989).

Como dito anteriormente, as células possuem a capacidade de identificar moléculas possivelmente indesejáveis, incluindo algumas do próprio citoplasma, e eliminá-las através da formação de um autolisossomo em um processo chamado autofagia. Atg5 é uma das moléculas essenciais para a formação da membrana de isolamento que irá produzir o autofagossomo. A *Shigella* possui em sua superfície marcadores para autofagia e entre eles uma porção da molécula VirG que é reconhecida por Atg5. Estudos têm revelado que tanto Atg5 e IcsB se ligam em VirG no mesmo ponto, no mesmo resíduo interno de aminoácido (319-507), sugerindo que IcsB se liga a VirG permitindo que o patógeno se mova, impelido pela actina polimerizada no citoplasma do hospedeiro, camuflado por IcsB, sem que seja reconhecido por Atg5 (Ogawa *et al.*, 2006).

A capacidade da bactéria de sobreviver e se disseminar entre as células vizinhas é um ponto chave para que se instale a infecção (Ogawa *et al.*, 2006). Na shigelose, a injúria fisiológica que inicia a cascata inflamatória é a invasão do epitélio do cólon e a lâmina basal.

Caracterização molecular

Surtos de doenças infecciosas são resultado da exposição de vários indivíduos a uma fonte comum de determinado agente infeccioso. Muitas vezes, o agente etiológico causador das infecções é derivado de uma única célula cuja progênie é geralmente idêntica ou intimamente relacionada com o organismo fonte. Em termos epidemiológicos, os indivíduos agentes infecciosos envolvidos nos surtos são clonalmente relacionados. Alguns métodos vêm sendo utilizados com o objetivo de se obter a tipagem molecular de agentes infecciosos e a escolha destes métodos requer a observação de alguns critérios: todos os organismos da espécie devem ser passíveis de serem analisados pelo método usado, que deve ser capaz de diferenciar espécies não relacionadas e demonstrar a relação dos organismos isolados. Além disso, o método escolhido deve ter boa reprodutibilidade (Olive e Bean, 1999).

Versalovic *et al.* (1991) descreveram duas metodologias para caracterização bacteriana através da análise dos padrões obtidos pela amplificação por PCR de elementos que se repetem no DNA genômico bacteriano. Quando estas seqüências não estão muito distantes no genoma, o DNA entre elas pode ser amplificado por PCR e, desta forma, o polimorfismo quanto ao número e à posição em que estas seqüências se localizam no genoma é usado para diferenciar linhagens. A comparação entre diferentes perfis eletroforéticos pode nos fornecer o grau de similaridade entre linhagens.

A seqüência de elementos extragênicos palindrômicos repetitivos (REP) tem sido descrita em muitas bactérias entéricas (Sharples e Lloyd, 1990; Hulton *et al.*, 1991). A natureza palindrômica dos elementos REP e sua habilidade de formar estruturas circulares, têm levado a se propor várias funções a estes elementos (Newbury *et al.*, 1987; Yang e Ames, 1988; Gilson *et al.*, 1990). REP é uma seqüência de 38 pb, com 6 posições

degeneradas e 5 posições variáveis na região central, usada para caracterização genotípica de várias espécies bacterianas (Navia *et al.*, 1999; Harrington *et al.*, 2007).

A sequência consenso intergênica repetitiva enterobacteriana (ERIC) é outra sequência de DNA que vem sendo bastante usada para tipagem de algumas espécies bacterianas (Sharples e Lloyd, 1990; Hulton *et al.*, 1991; Silveira *et al.*, 2002; Falcão *et al.*, 2006; Wilson e Sharp, 2006) e, entre elas, *Shigella spp* (Liu *et al.*, 1995). A sequência ERIC é composta por 126 pb que contém contendo uma região central altamente conservada, formada por repetições invertidas (Versalovic *et al.*, 1991)

Os padrões obtidos por ERIC são normalmente menos complexos que os obtidos por REP, mas ambos fornecem bom nível discriminatório entre as linhagens bacterianas. A avaliação das linhagens por ambas as técnicas, ERIC e REP-PCR aumenta o poder discriminatório em relação ao uso de cada técnica isoladamente (Olive e Bean, 1999; Ferreira *et al.*, 2001). Alguns trabalhos têm usado a reação em cadeia da polimerase para análise e comparação dos isolados de *Shigella spp*. (Navia *et al.*, 1999; Surdeanu *et al.*, 2003; Penatti *et al.*, 2007).

Em estudos de epidemiologia molecular, a análise dos padrões de macro-restrição em gel por eletroforese em campo pulsado (pulsed field gel electrophoresis - PFGE) é considerada o método mais confiável, discriminatório e reprodutível, em relação a outros métodos bioquímicos e moleculares (Schwartz e Cantor, 1984; Murray *et al.*, 1990; Prevost *et al.*, 1992; Tenover *et al.*, 1994; Grundmann *et al.*, 1995; Barbier *et al.*, 1996; Olive e Bean, 1999; Ross *et al.*, 2005; Chiou *et al.*, 2006), permitindo um alto grau de detecção de polimorfismo do DNA (Straden *et al.*, 2003) para usos epidemiológicos (Régua-Mangia *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) e para tipagem rotineira de linhagens de *Shigella* (DeLappe *et al.*, 2003). Por isto, muitos trabalhos utilizam PFGE para análises

epidemiológicas e caracterização genotípica de *Shigella spp* (Liu *et al.*, 1995; Navia *et al.*, 1999; DeLappe *et al.*, 2003; Chiou *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007). O método de PFGE permite uma separação de grandes fragmentos, de 10 a 800 kb do DNA genômico e, entre os fatores que limitam sua utilização, estão o grande tempo necessário para a realização de toda a análise e a dificuldade de se analisar um grande número de amostras (Olive e Bean, 1999).

O desenvolvimento de *softwares* para análise dos padrões de restrição, obtidos por PFGE, tem possibilitado a criação de bancos de padrões para todos os organismos, onde as linhagens podem ser comparadas para identificar sua relação filogenética com outras similares (revisado por Olive e Bean, 1999).

Técnicas moleculares, combinadas com técnicas tradicionais, são usadas para diferenciar espécies e linhagens de bactérias patogênicas (Ochman *et al.*, 1983; Pupo *et al.*, 1997; Penatti *et al.*, 2007). As análises moleculares agregam informações a respeito da endemicidade das linhagens de *Shigella* isoladas, por identificar as múltiplas populações circulantes e, desta forma, colaborar no desenvolvimento de estratégias de intervenção e prevenção.

No presente estudo, as metodologias de ERIC-PCR, REP-PCR e PFGE foram utilizadas para genotipar 119 linhagens de *Shigella* (61 *S. flexneri* e 58 *S. sonnei*), isoladas de casos de shigeloses que ocorreram em duas áreas metropolitanas localizadas a 250 Km de distância (Campinas e Ribeirão Preto), no estado de São Paulo. Além disso, as linhagens foram submetidas à análise de seu perfil de integrons. A proposta deste estudo foi analisar a relação genética entre as linhagens e determinar, caso hajam, os clones geograficamente predominantes. Estudos como estes podem colaborar para o desenvolvimento de estratégias

para prevenir a disseminação da doença, fornecendo dados e informações sobre o padrão de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens destas regiões.

2. Objetivos

Realizar a análise clonal comparativa e caracterização de 119 linhagens de *Shigella spp.*, isoladas de casos de shigelose ocorridos nas regiões metropolitanas de Campinas e Ribeirão Preto, através de reação de PCR utilizando iniciadores específicos (ERIC-PCR e REP-PCR) e da técnica de macro-restrição em gel de eletroforese com campo pulsado (PFGE).

Verificar a presença e determinar o perfil de integrons das linhagens estudadas, usando a técnica de PCR em tempo real.

Gerar dados epidemiológicos a respeito das shigeloses entre diferentes regiões metropolitanas do estado, a partir da caracterização, determinação da origem e de possível correlação entre as linhagens analisadas.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas

Neste estudo foram utilizadas 119 linhagens de *Shigella spp.* isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de shigelose em diferentes cidades do estado de São Paulo. Entre as linhagens estudadas, cinquenta e nove linhagens foram isoladas na região de Ribeirão Preto, das quais 28 são *S. sonnei* e 31 são *S. flexneri*, e sessenta linhagens foram isoladas na região de Campinas, das quais 30 são *S. sonnei* e 30 são *S. flexneri*.

As linhagens provenientes da região metropolitana de Ribeirão Preto foram isoladas a partir de pacientes atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob coordenação do Prof. Dr. Roberto Martinez, no período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000 e gentilmente cedidas, juntamente com seu perfil de resistência a antimicrobianos, pelo Prof. Dr. Marcelo Brocchi (IB-UNICAMP). As amostras provenientes da região metropolitana de Campinas foram gentilmente cedidas, juntamente com seu perfil de resistência a antimicrobianos, pela Dra. Marilu Mendes Moscardini Rocha (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo), e isoladas entre 1997 e 2001.

Informações referentes à cidade de origem, data de isolamento e perfil de resistência a antimicrobianos estão dispostas nas tabelas 1, 2, 3 e 4 e na figura 1.

Tabela 1: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. flexneri* (CF) isoladas na região metropolitana de Campinas.

<i>S. flexneri</i>	Data do Isolamento	Cidade	Idade do paciente	Resistência antimicrobiana
CF1A	02/11/87	SJBV	44	AP, ET, SUT
CF1B	02/11/87	SJBV	12	AP, ET, SUT
CF2	03/10/89	C	2	CO, ET, SUT, TT
CF3	23/04/90	J	35	ET, SUT
CF4	24/11/97	C	8m	AP, CO, ET, SFT, TT
CF5	30/12/97	C	6m	AP, CO, ET, SFT, TT
CF6	11/02/98	C	2	AP, CO, ET, SFT, TT
CF7	16/09/98	C	4	AP, ET, SUT, TT
CF8	21/01/99	C	1	AP, CO, ET, SUT, TT
CF9	17/02/99	C	70	AP, CO, ET, SUT, TT
CF 10	29/03/99	C	29	CO, ET, SUT, TT
CF11	30/09/99	C	11m	AP, CO, ET, SUT, TT
CF12A	12/11/99	I	50	AP, CO, ET, SUT, TT
CF12B	12/11/99	I	40	AP, CO, ET, SUT, TT
CF12C	16/11/99	I	4	AP, CO, ET, SUT, TT
CF12D	30/11/99	I	19	AP, CO, ET, SUT, TT
CF13	14/02/00	C	8m	AP, CO, ET, SUT, TT
CF14	02/05/00	C	5	AP, CO, ET, SUT, TT
CF15	15/05/00	C	3	AP, CF, CO, ET, SUT, TT
CF16	05/06/00	C	4	AP, ET, SUT, TT
CF17	10/07/00	C	6m	AP, ET, SUT, TT
CF18	10/07/00	C	-	AP, ET, TT
CF19	15/08/00	C	1,5	AP, CO, ET, SUT, TT
CF20	10/11/00	C	5	AP, CO, TT
CF21	14/11/00	C	50	AP, CO, SUT, TT
CF22	21/12/00	C	5	AP, CO, ET, SUT, TT
CF23	16/01/01	C	40	AP, CO, ET, SUT, TT
CF24	22/01/01	C	10m	ET, TT
CF25	18/06/01	MG	49	SUT
CF26	27/12/01	C	3	AP, CO, TT

Cidades da região de Campinas: São João da Boa Vista (SJBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS), Vinhedo (VIN). Antimicrobianos: AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina.

Tabela 2: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. sonnei* (CS) da região metropolitana de Campinas.

<i>S. sonnei</i>	Data do isolamento	Cidade	Idade do paciente	Resistência antimicrobiana
CS1	14/02/97	MG	23	ET, SUT, TT
CS2	14/05/97	BP	15	AP, ET, SUT
CS3	15/10/98	L	11	ET, SUT, TT
CS4	24/06/99	C	10	SUT, TT
CS5	10/03/00	C	2	AP, SUT, TT
CS6	23/05/00	C	7m	ET, SUT, TT
CS7	31/05/00	C	87	ET, SUT, TT
CS8	02/06/00	C	2	ET, SUT, TT
CS9	25/01/01	COS	2	SUT, TT
CS10	02/03/01	C	9	ET, SUT, TT
CS11	02/03/01	C	3	SUT, TT
CS12	08/03/01	C	3	ET, SUT, TT
CS13	10/05/01	C	1	SUT, TT
CS14	29/06/01	C	-	SUT, TT
CS15	05/07/01	C	-	SUT, TT
CS16A	28/02/02	C	4	SUT, TT
CS16B	28/02/02	C	3	SUT, TT
CS16C	28/02/02	C	5	SUT, TT
CS16D	28/02/02	C	4	SUT, TT
CS16E	28/02/02	C	5	SUT, TT
CS16F	28/02/02	C	-	SUT, TT
CS16G	07/03/02	C	6	SUT, TT
CS16H	11/03/02	C	42	SUT, TT
CS16I	26/03/02	C	6	SUT, TT
CS17	06/03/02	C	5	SUT, TT
CS18	15/03/02	C	-	SUT, TT
CS19A	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
CS19B	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
CS19C	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
CS20	03/05/02	C	-	SUT, TT

Cidades da região de Campinas: São João da Boa Vista (SJBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS), Vinhedo (VIN). Antimicrobianos: AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina.

Tabela 3: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. flexneri* (RF) da região metropolitana de Ribeirão Preto.

<i>S. flexneri</i>	Data de isolamento	Cidade	Idade do paciente	Resistência antimicrobiana
RF02	04/01/99	CJ	48	AMI, AP, CO, GEN, SUL, TT, TOB
RF03	06/01/99	RP	1.5	-
RF07	18/01/99	GU	7m	SUL, TT
RF21	09/02/99	RP	21	AP, CO, SUL, TT
RF23	23/02/99	RP	1m	SUL
RF24	10/03/99	RP	3.5	AP, CO, SUL, TT
RF25	15/03/99	RP	3.5	AP, CO, SUL, TT
RF26	15/03/99	RP	1.5	AP, SUL, TT
RF27	15/03/99	JD	6m	SUL, TT
RF28	24/03/99	RP	9m	SUL, TT
RF29	24/03/99	RP	8m	SUL, TT
RF31	02/04/99	RP	4m	AP, SUL
RF32	07/04/99	RP	20	AP, CO, SUL, TT, TOB
RF34	09/04/99	RP	4m	AP, CO, SUL, TT
RF35	07/05/99	PO	4	SUL, TT
RF37	14/06/99	RP	9m	SUL, TT
FR41	09/07/99	RP	6m	AP, SUL, TT
RF43	08/09/99	PI	2	SUL, TT
RF44	16/08/99	BA	9m	AP, CO, GEN, SUL, TT, TOB
RF45	20/08/99	RP	3	AP, CO, TT
RF47	15/09/99	RP	16	AP, SUL, TT
RF48	13/10/99	RP	9m	AP, CO, SUL, TT
RF53	03/11/99	RP	26	TT
RF54	04/11/99	RP	7m	AP, SUL, TT
RF55	08/11/99	RP	10m	SUL, TT
RF56	13/11/99	RP	3	SUL, TT
RF57	19/11/99	RP	11m	AP, SUL, TT
RF60	25/11/99	RP	9m	AP, SUL
RF63	30/12/99	RP	2	AP, SUL, TT
RF64	30/12/99	RP	27	AP, CO, SUL, TT
RF67	18/01/00	RP	5m	SUL, TT

Cidades da região de Ribeirão Preto: Cajuru (CJ), Guatapar  (GU), Jardinópolis (JD), Pontal (PO), Pitangueiras (PI), Barrinha (BA) e Ribeirão Preto (RP). Antimicrobianos:

Cloranfenicol (CO), Amicacina (AMI), Ampicilina (AP), Cefalotina (CF), Cefoxitina (CFX), Gentamicina (GEN), Sulfonamida (SUL), Tetraciclina (TT), Tobramicina (TOB), Ácido nalidíxico (NAL).

Tabela 4: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. sonnei* (RS) da região metropolitana de Ribeirão Preto.

<i>S. sonnei</i>	Data do isolamento	Cidade	Idade do paciente	Resistência antimicrobiana
RS5	11/01/99	RP	6.5	SUL
RS6	18/01/99	RP	3	AP, CF, SUL
RS8	19/01/99	RP	14	SUL, TT
RS9	21/01/99	RP	5	CF, SUL, TT
RS10	21/01/99	RP	11.5	AP, CF, SUL, TOB
RS11	21/01/99	RP	6	AP, CF, SUL
RS15	25/01/99	RP	5.5	NR
RS16	26/01/99	RP	5	SUL, TT
RS17	02/02/99	RP	1	NR
RS22	22/02/99	CA	41	NR
RS25	22/02/99	RP	-	-
RS30	31/03/99	RP	5	AP, SUL
RS33	08/04/99	JD	10m	SUL, TT
RS38	18/06/99	RP	5	SUL, TT
RS42	09/08/99	RP	9m	SUL, TT
RS46	15/09/99	BA	2	SUL, TT
RS49	22/10/99	RP	3	NR
RS50	22/10/99	RP	5	AP, SUL
RS51	29/10/99	BA	5	SUL, TT
RS52	02/11/99	RP	4	AP, SUL
RS61	25/11/99	RP	2m	AP, SUL
RS62	04/12/99	BA	4m	SUL, TT
RS65	10/01/00	RP	6.5	AP, SUL
RS68	19/01/00	CC	5	AP, SUL
RS69	27/01/00	RP	7	AP, SUL
RS70	28/01/00	JD	4m	AP, SUL
RS71	07/02/00	BA	3	AP, SUL, TT
RS72	08/02/00	NU	2	SUL, TT

Cidades da região de Ribeirão Preto: Jardinópolis (JD) Barrinha (BA), Ribeirão Preto (RP), Cambirá (CA), Cássia dos Coqueiros (CC) e Nuporanga (NU). Antimicrobianos: Cloranfenicol (CO), Amicacina (AMI), Ampicilina (AP), Cefalotina (CF), Cefoxitina

(CFX), Gentamicina (GEN), Sulfonamida (SUL), Tetraciclina (TT), Tobramicina (TOB), Ácido nalidíxico (NAL), não apresentou resistência (NR).

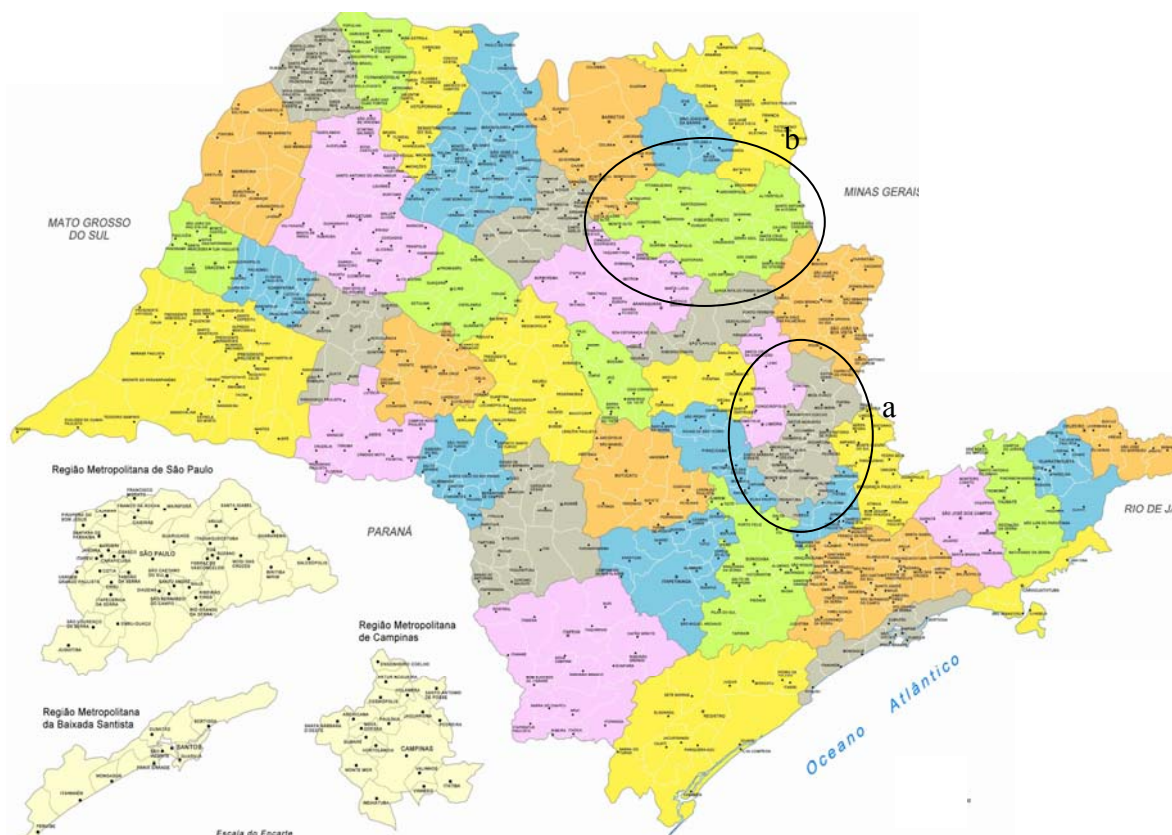


Figura 1: Mapa do estado de São Paulo indicando as cidades e a localização das regiões metropolitanas de Campinas (a) e Ribeirão Preto (b).

3.2. Meios de Cultura e Soluções

Meios de Cultura

3.2.1- Luria Bertani (LB) (Miller, 1972)

Triptona	10 g
Cloreto de sódio	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000 mL

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.2.2- Meio ágar Mac Conkey

O meio de cultura utilizado foi adquirido da Oxoid. Após o preparo, o meio foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.2.3. Meio ágar *Salmonella Shigella* (SS)

O meio de cultura utilizado foi adquirido da Difco. Após o preparo, o meio foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.2.4. Meio de Hogness (estoque) (Werner *et al.*, 1997)

K ₂ HPO ₄	6,30 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O . 2 H ₂ O	0,45 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,09 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,90 g
KH ₂ PO ₄	1,80 g
Glicerol	44,00 mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 mL

Após o preparo, a solução foi esterilizada sob vapor fluente, durante 30 minutos. Para o estoque das amostras bacterianas (- 70°C), foram adicionados 500 µLde solução de Hogness a 500 µLde meio LB contendo a amostra.

Soluções

3.2.5. Tampão Tris-HCl 1M pH 8,0

121,1 g de Tris-base foram adicionados a 800 mL de água deionizada. Após a completa dissolução do Tris-base, foi adicionado ácido clorídrico concentrado (HCl fumegante) até que a solução atingisse pH 8. Água deionizada foi adicionada ao tampão até completar o volume de 1000 mL de solução. O tampão foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.6. Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1)

Clorofórmio	24 mL
Álcool Isoamílico	1 mL

3.2.7. Tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE)

Para o preparo do tampão Tris-EDTA foram utilizados os tampões Tris-HCl (pH 8,0), para uma concentração final de 10 mM, e EDTA pH 8,0, para uma concentração final de 1 mM. Depois de preparado o tampão foi autoclavado a 121°C, durante 20 minutos e armazenado sob refrigeração a 4°C.

3.2.8. Solução de EDTA 0,5M pH8,0

A 86,1 g de EDTA dihidratado foram misturados a 800 mL de água deionizada. Sob agitação vigorosa o pH foi ajustado para 8 com adição de solução 10 N de NaOH. Após o ajuste do pH foi adicionada água até que o volume da solução atingisse 1000 mL. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 20 minutos e armazenada a -20°C.

3.2.9. Solução de NaCl 5 M

292,10 g de NaCl foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada. A solução foi mantida a 4°C.

3.2.10. Solução de CTAB/NaCl (Brometo de Cetramônio/NaCl) (Ausubel *et al.*, 1988)

8 g de brometo de cetramônio e 4 g de NaCl foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada pré-aquecida a 65°C. Após a dissolução completa dos reagentes, o volume da solução foi completado para 100 mL com água deionizada pré-aquecida a 65°C. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.11. Tampão de ressuspensão de DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Os corantes azul de bromofenol e xileno cianol foram adicionados a uma concentração final de 0,25%, a uma solução de 50% de sacarose. O tampão foi armazenado a 4°C.

3.2.12. Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Tris-base	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0,5 M	20,0 mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,0 mL

Após o preparo a solução foi armazenada a 4°C.

3.2.13. Solução corante de brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook *et al.*, 1989)

Brometo de etídio 1%	0,05 mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 mL

3.2.14. Gel de agarose

A agarose (nas concentrações finais desejadas) foi dissolvida em tampão TEB 1X em forno de microondas, resfriada e colocada em cuba de eletroforese horizontal.

3.2.15. Tampão de suspensão de células

Tris pH7,2.....	100mM
NaCl	20mM
EDTA	100mM

3.2.16. Tampão de remoção de proteínas

EDTA pH9.....	0,25M
Sarcosil	0,5%
Proteinase K	0,5mg/mL

3.3. Métodos

3.3.1. Condições de Cultivo e Estoque

As linhagens bacterianas foram cultivadas em ágar Mac Conkey (Oxoid), SS (Difco) e caldo Lúria Bertani (LB) (Miller, 1972). Depois de incubadas por 18 a 24 horas a 37°C em LB, uma alíquota de cada linhagem foi misturada em tubos criogênicos, na proporção de 1:1, a uma solução de Hogness e homogenizada em vortex (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). A suspensão obtida foi armazenada em freezer a - 70°C.

3.3.2. Extração de DNA genômico

As células bacterianas foram cultivadas em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) por 16 horas a 37° C. O DNA genômico foi extraído segundo metodologia descrita por Ausubel *et al.* (1988), com algumas modificações.

Um mililitro (1 mL) de cada suspensão bacteriana foi centrifugado em microcentrífuga (Incibrás – Instrumentação Científica Brasileira, São Paulo – SP, Brasil) (12.000 rpm por 3 minutos), o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células bacterianas lavado duas vezes em tampão TE (Tris-EDTA), por centrifugação

(12.000 rpm por 1 minuto). Em seguida o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 400 µL de tampão TE 1X, 50 µL de lisozima (10mg/mL) (Invitrogen-Life Technologies, EUA) e 1 µL de RNase (10 mg/mL) (Invitrogen-Life Technologies, EUA). A mistura foi homogeneizada sob forte agitação em vortex (Phoenix – AP56) e incubada em banho termostatzado a 37°C por 2 a 3 horas. À suspensão foram adicionados 70 µL de SDS 10% (duodecil sulfato de sódio) e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) sendo a mistura homogeneizada em vortex e incubada a 65°C por 10 minutos em banho termostatzado. Volumes de 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de uma solução de CTAB/NaCl aquecida a 65°C foram adicionados à suspensão, que foi agitada em vortex até a formação de um líquido de aspecto leitoso, e incubada a 65°C por 10 minutos em banho termostatzado. Transcorrido este período, 750 µL de uma solução (24:1) de clorofórmio: álcool isoamílico (USB/Quimex, Brasil/Mallinckrodt, EUA), foram adicionados à suspensão que foi agitada em vortex por 10 segundos e centrifugada à temperatura ambiente (12.000 rpm por 5 min), obtendo-se a formação de três fases. O sobrenadante aquoso foi cuidadosamente transferido para outro tubo de polipropileno para microcentrífuga. O DNA foi precipitado através da adição de 0,6 volumes de Isopropanol (Quimex, Brasil) a -20°C e incubado a -20°C por 30 min. A suspensão foi, a seguir, centrifugada (5 minutos a 12.000 rpm) à temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado três vezes com 1 mL de Etanol (Quimex, Brasil) 70% a -20°C, sob centrifugação (3 minutos a 12.000 rpm). O DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e cuidadosamente ressuspensão em 100 µL de água deionizada esterilizada. A concentração e pureza do DNA foram determinadas por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm, como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

3.3.3. Determinação de relação clonal por ERIC e REP-PCR

As amplificações por PCR utilizadas na genotipagem molecular foram realizadas segundo as condições e metodologia descrita por Versalovic *et al.* (1991) para ERIC e REP-PCR. Cada reação, com um volume final de 100 µL, continha 50 pmol de cada iniciador (Invitrogen – Life Technologies), 1,25 mM de cada dNTP (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂, 1 unidade da enzima KlenTaq1™ DNA polimerase (AB Peptides, Inc. EUA) e 100 ng do DNA molde, em tampão de reação apropriado fornecido pelo fabricante da enzima. Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de ERIC-PCR e REP-PCR.

Iniciador	Seqüência
ERIC 1R	5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3'
ERIC 2	5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3'
REP 1R1	5' - III ICG ICG ICA TCI GGC – 3'
REP 2	5' - ICG ICI TAT CIG GCC TAC – 3'

A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina, I = inosina

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC200 (MJ Research – MA, Waltham, USA).

Para as amplificações de ERIC-PCR o DNA genômico (acrescido de dNTP, iniciadores, MgCl₂ e tampão) foi inicialmente desnaturado com um ciclo a 95° C por 7 min, sendo, em seguida, adicionadas 2,5 U da enzima e a amplificação realizada em 30 ciclos das seguintes etapas: desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 52° C por 1 min e extensão a 65° C por 8 min, seguidas de uma extensão final a 65° C por 16 minutos.

Para as amplificações de REP-PCR o DNA genômico (acrescido de dNTP, iniciadores, MgCl₂ e tampão) foi inicialmente desnaturado com um ciclo a 95° C por 7

min, sendo, em seguida, adicionadas 2,5 U da enzima e a amplificação realizada em 30 ciclos das seguintes etapas: desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 40° C por 1 min e extensão a 65° C por 8 min, seguidas de uma extensão final a 65° C por 16 min.

Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata e, em caso de discordantes, repetidas uma terceira vez.

Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen-Life Technologies) 1,5%, em cubas horizontais (Horizon 11.14, Gibco BRL – Life Technologies), a 80 Volts, em tampão TEB. Em cada canaleta foram aplicados 10 µL do produto da reação de PCR, juntamente com 5 µL do tampão de ressuspensão 5X ((Gibco BRL, EUA) e 0,25% de Azul de Bromofenol (Gibco BRL, EUA). O gel foi, finalmente, corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989) e visualizado sob luz ultravioleta com um transluminador de mesa (UPV) e a imagem registrada pelo sistema software Kodac 1D Science.

3.3.4. Padrão de macro-restrição em gel de eletroforese com campo pulsado

A análise do padrão de restrição em PFGE foi realizada de acordo com metodologia descrita por Yatsuyanagi *et al.* (2002), com algumas modificações.

As linhagens bacterianas foram cultivadas sob agitação em meio LB a 37°C, por 16 horas. A seguir, foram diluídas a 1:50 em 10 mL do mesmo meio e, novamente, incubadas até que atingissem densidade óptica de aproximadamente 0,6 (660 nm). Dois mililitros das culturas foram centrifugados (5000 rpm por 4 minutos), e o sedimento ressuspensão em 500 µL de tampão de suspensão de células e colocado em banho termostaticado a 50°C. Foram acrescentados a cada amostra, 500 µL de agarose “low melting” (Gibco-BRL) a 2%, em

tampão de suspensão de células. Cada amostra foi distribuída em 5 poços de um molde para “plugs” e colocada por 5 minutos em geladeira para a solidificação dos “plugs”. Os “plugs” foram colocados em tubos de 15 mL, contendo 5 mL de tampão de suspensão de células com 1mg/mL de lisozima (Invitrogen-Life Technologies, EUA). Depois de incubados por 2 horas e lavados com água esterilizada, foram adicionados aos “plugs” 5mL de tampão de remoção de proteínas e incubados durante à noite a 50°C. Os “plugs” foram lavados 4 vezes por 30 minutos com 5 mL de tampão TE, sob leve agitação, sendo os “plugs” sobressalentes armazenados a 4°C em TE 10X. Para uso, o “plug” armazenado foi lavado por 1 hora com tampão da enzima. Decorrido este tempo foram acrescentados 300 µL de tampão da enzima e 40 unidades da enzima Xba I (Amersham *Pharmacia* Biotec) (nas condições especificadas pelo fabricante) e o mesmo incubado à 37°C em banho termostaticado, durante a noite. O “plug” foi posteriormente lavado com 500 µL de tampão TE, sob leve agitação, por 30 minutos e inserido em gel de agarose a 1% para corrida eletroforética. Os fragmentos de restrição de DNA foram separados por PFGE com o aparato CHEF DRIII (Laboratório Bio-Rad) em agarose 1% (Serva, Heidelberg, Germany) em campo de força de 6 V/cm, por 22 horas a 14°C, com pulsos de 5 a 35 segundos. Um marcador de peso molecular Lambda (BioLabs – New England) foi utilizado para comparação. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µL/mL), e visualizado sob luz ultravioleta através de um transluminador de mesa (UPV) e a imagem registrada pelo sistema software Kodac 1D Science. Os padrões de macro-restrição obtidos por PFGE foram analisados segundo os critérios apresentados por Tenover *et al.* (1995).

3.3.5. Análise da similaridade genética.

No agrupamento dos padrões de macro-restrição obtidos por PFGE e dos padrões de polimorfismo gerados por ERIC e REP-PCR, foi utilizado o software GelCompar II (version 2.0, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). O dendrograma de similaridade foi construído usando o índice de similaridade Dice, método de agrupamento por pares não ponderado com média aritmética (UPGMA).

3.3.6. Pesquisa de integrons em linhagens de *S. sonnei*

A pesquisa da presença de integrons foi realizada em 25 das 30 linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Campinas (tabela 8). A pesquisa de integrons, assim como o seqüenciamento dos mesmos, em algumas das linhagens, foi feita em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Jun Yu da University of Strathclyde Royal College, na Escócia.

A seleção de colônias possivelmente virulentas foi feita adicionando-se 1% do corante Vermelho do Congo ao Ágar Triptose de Soja (TSA), que foi vertido em placas de petri de 9 centímetros (Scientific Laboratory Supplies Ltd.) (Sakai *et al.*, 1986). As linhagens possivelmente virulentas produzem colônias avermelhadas neste meio de cultura (Apella *et al.*, 1992).

3.3.6.1. Extração de DNA genômico para pesquisa de

A partir das placas incubadas, apenas as colônias coradas em vermelho foram selecionadas e o DNA extraído usando o kit “DNeasy Blood and Tissue”, de acordo com o protocolo do manual “DNeasy Blood and Tissue” (Spin-Column, Quagen Ltd., USA, 2006).

3.3.6.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Os iniciadores específicos para o Integron de classe 1, Integron de classe 2, e para o Integron de classe 3 foram desenhados a partir da sequência obtida por pesquisa na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que foi empregada no software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) (tabela 6). A análise de PCR em tempo real foi feita pela amplificação dos genes *int 1*, *int 2* e *int 3*, segundo a metodologia descrita por Maguire *et al.* (2001), com algumas modificações. As reações de trabalho continham: 6 µL da mistura “Faststart Universal SYBR Green Master” (Roche Diagnostics Ltd. Mannheim, Germany), 1 µL do iniciador da direita a 50 pmol/ µL, 1 µL do iniciador da esquerda a uma concentração de 50 pmol/ µL e 2 µL do DNA molde. As reações de amplificação foram realizadas com uma desnaturação inicial de 1 ciclo a 90° C por 60 segundos e em 45 ciclos (50 ciclos para o Integron 1) das seguintes etapas: desnaturação a 95° C por 20 segundos, anelamento a 58° C por 20 segundos (MWG guidelines - Eurofins MWG operon) e extensão a 72° C por 22 segundos. Amplificações cujos sinais iniciaram-se depois do trigésimo ciclo frequentemente indicam resultados negativos sendo, portanto, considerados resultados “falso positivo”. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose, de acordo com protocolo sugerido por Sambrook *et al.* (1989).

Tabela 6: Lista de iniciadores utilizados para o PCR em Tempo Real.

	Integron 1	Integron 2	Integron 3
Iniciador da esquerda	atgcccggtccatacagaag	aatgcgttgcacttcatttg	ccggttcagtccttcctcaa
Iniciador da direita	cggccttgctgttctctac	atgggcagtgaagaggtag	gaggcgtgtatctgcctcat
Produto	183 pb	207 pb	155 pb

3.3.6.3. Purificação do DNA e Seqüenciamento

O DNA obtido da reação de PCR em tempo real foi purificado através do uso do kit de purificação de DNA da Qiagen (Qiagen Ltd., USA, 2006), de acordo com o protocolo do fabricante e encaminhado para o seqüenciamento no MWG (Eurofins MWG operon) para verificação da presença das seqüências *int1*, *int2* e *int3*.

4. Resultados

4.1. Análise dos casos de shigelose

Dos 119 casos de shigeloses estudados neste trabalho, 33 (56,9%) dos causados por *S. sonnei* e 43 (64,2%) dos causados por *S. flexneri* afetaram crianças com até 5 anos de idade (tabelas 1, 2, 3 e 4) (figura 2).

Número de linhagens / faixa etária

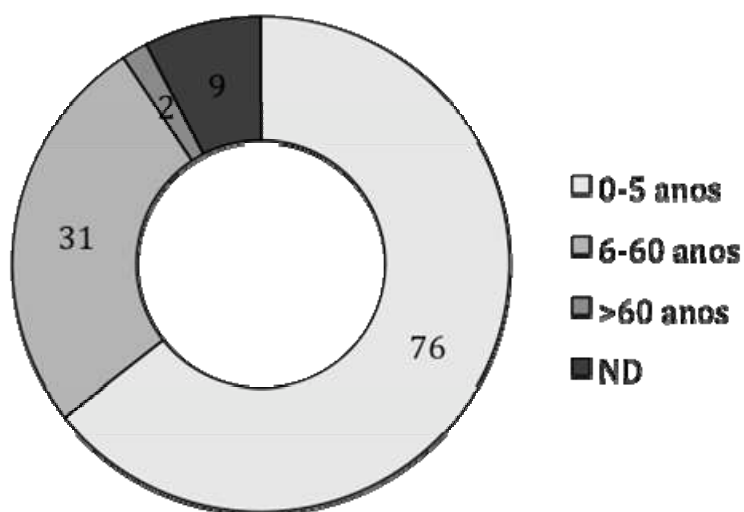


Figura 2: Gráfico ilustrando a proporção entre o número de linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri*, em ambas as regiões, isoladas de indivíduos em diversas faixas etárias. ND: idade não definida

A maior parte dos casos de shigelose analisados ocorreram no período do ano que corresponde ao verão (figura 3). Um total de 54 linhagens, entre as 119 do presente estudo, entre elas 33 *S. sonnei* e 21 *S. flexneri*, foram isoladas durante o verão. A relação entre o

número de linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri*, das distintas regiões, isoladas nas diferentes estações do ano pode ser visualizada na tabela 7.

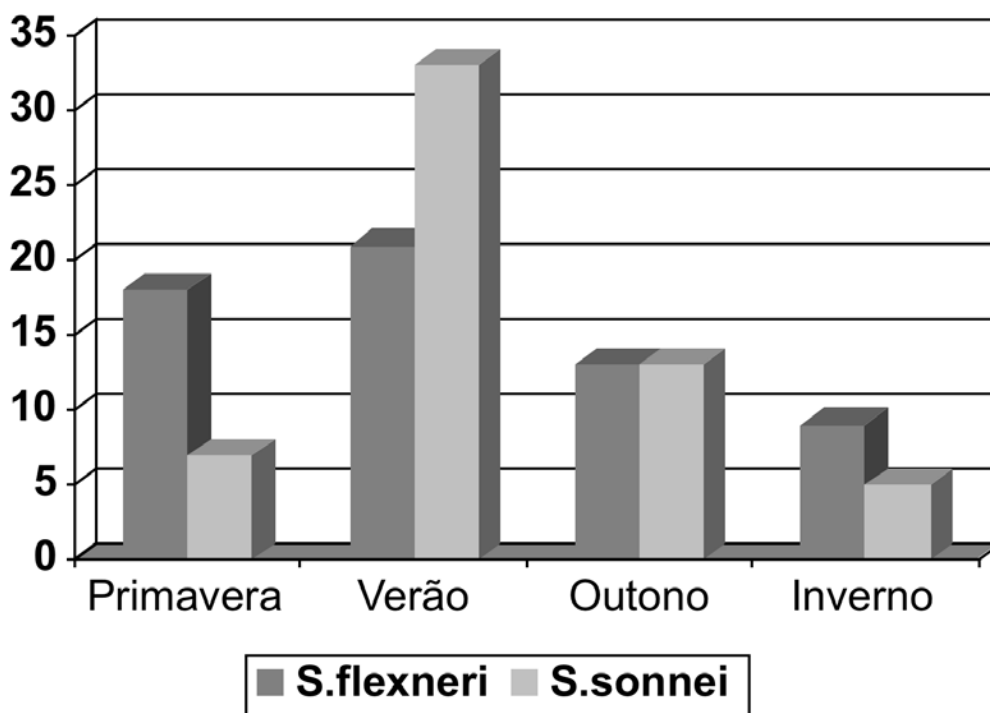


Figura 3: Distribuição do número de isolamentos de linhagens de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, em ambas as regiões, em relação às estações do ano.

Tabela 7: Distribuição do número de linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri* das regiões de Campinas e Ribeirão Preto isoladas nas diferentes estações do ano.

	Campinas		Ribeirão Preto		Total por estação
	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	
Primavera	11	1	7	6	25
Verão	9	16	12	17	54
Outono	6	10	7	3	26
Inverno	4	3	5	2	14
Total	30	30	31	28	

4.2. ERIC e REP-PCR

A partir da análise do padrão de bandas apresentado por cada uma das 119 linhagens através das técnicas de ERIC-PCR e REP-PCR, obteve-se um dendrograma de similaridade onde as linhagens foram agrupadas em 13 grupos com 100% de similaridade genética (tabela 8, figuras 5). O padrão de bandas apresentado pelos grupos de identidade pode ser visualizado na figura 4.

As linhagens de *S. flexneri* e *S. sonnei* foram agrupadas, separadamente em dois grupos principais, X e Y, respectivamente (figura 5). O grupo X (*S. flexneri*) é composto por alguns grupos de identidade (com 100% de similaridade) (rf1, rf2, rf3, rf5) compostos por linhagens provenientes da região de Ribeirão Preto e por um grupo de identidade (cf4) que contém todas as linhagens provenientes de Campinas. O grupo rf1 contém a maior parte das linhagens de *S. flexneri* isoladas em Ribeirão Preto, com 39,4 % de todas as linhagens do grupo X. O grupo Y (*S. sonnei*) foi dividido em dois grandes grupos, Y1 e Y2. O grupo Y2 (rs13), composto por linhagens de Ribeirão Preto, corresponde a 3,5% das linhagens de *S. sonnei*. O grupo Y1 foi dividido em dois subgrupos, o Y3 (44.82% das linhagens deste grupo) composto por linhagens de Ribeirão Preto e Y4 (51.69% das linhagens deste grupo) composto por linhagens de Campinas.

Todas as linhagens de *S. sonnei* da região de Campinas, isoladas a partir do ano 2000 (26 linhagens), exceto as linhagens CS7 e CS19C, foram agrupadas no grupo cs9 (tabela 10), sendo observado um agrupamento em relação ao ano de isolamento.

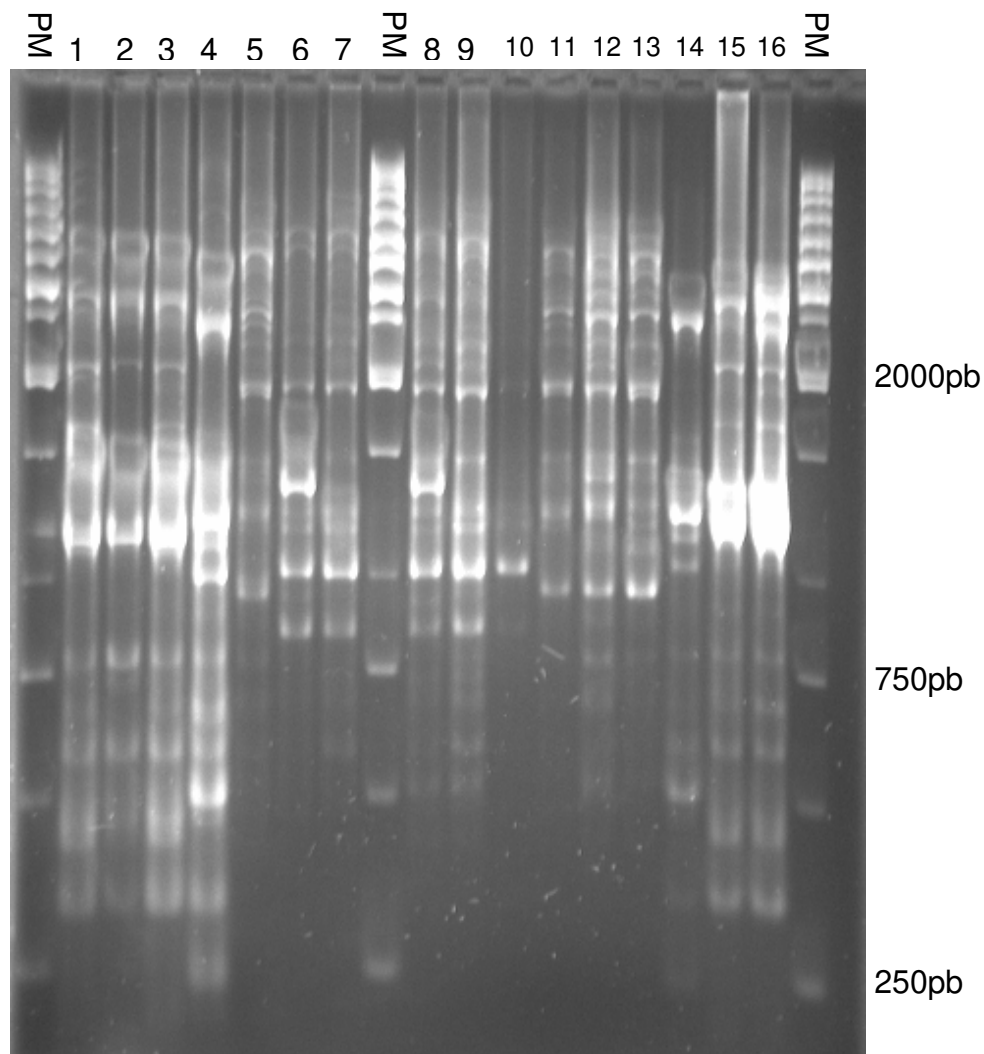


Figura 4: Gel de agarose (1,5%) onde pode ser observado o padrão de amplificação característico dos grupos com 100% de similaridade genética obtidos pelas técnicas de ERIC e REP-PCR: 1 (grupo cs10), 2 (grupo cs11), 3 (grupo cs9), 4 (grupo cf4), 5 (grupo cf4), 6 (grupo cs12), 7 (grupo cs9), 8 (grupo rf1), 9 (grupo rs8), 10 (grupo rs6), 11 (grupo rs6), 12 (grupo rs8), 13 (grupo rs13), 14 (grupo rf1), 15 (grupo rf2), 16 (grupo rf1). Os grupos rf são compostos por linhagens de *S. flexneri* isoladas na região de Ribeirão Preto. Os grupos rs são compostos por linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Ribeirão Preto.

O grupo cf é composto por linhagens de *S. flexneri* isoladas na região de Campinas. Os grupos cs são compostos por linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Campinas.

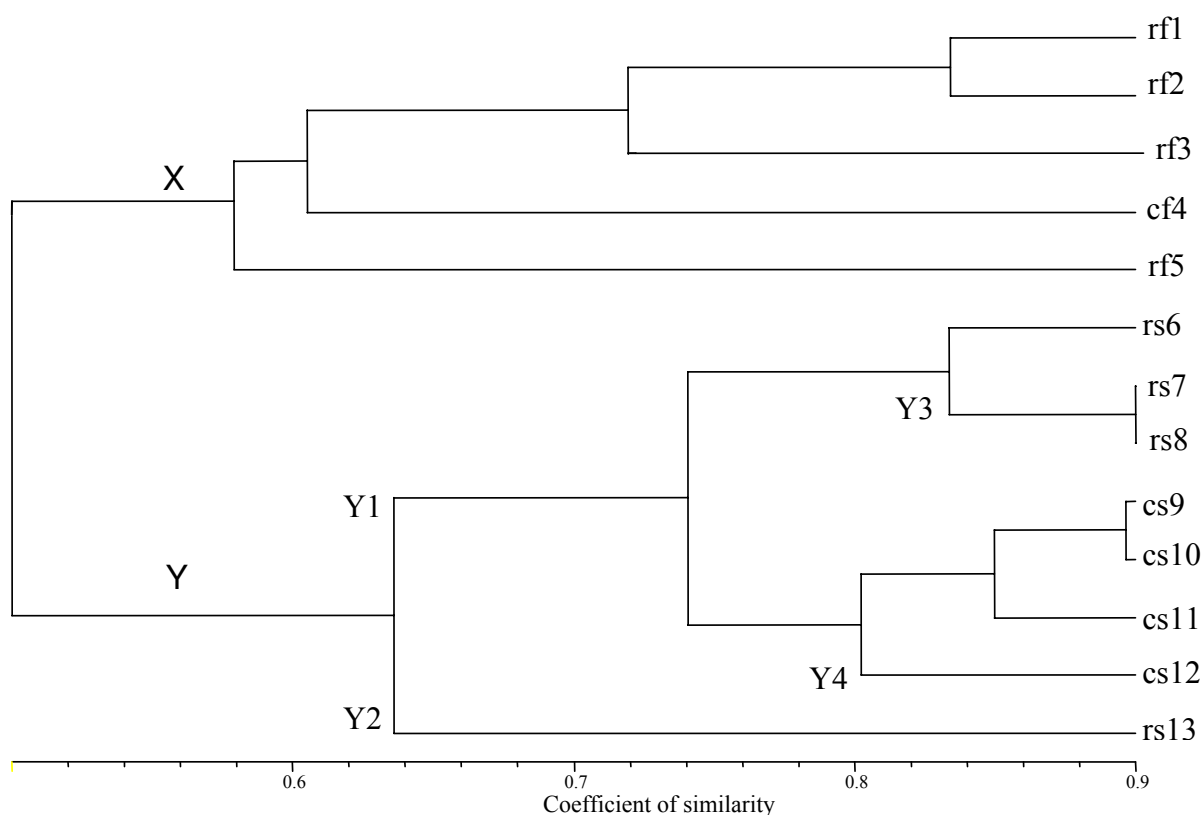


Figura 5: Dendrograma de similaridade obtido a partir da análise dos padrões de amplificação obtidos por ERIC e REP-PCR. Agrupamento X corresponde a linhagens de *S. flexneri* e Agrupamento Y corresponde a linhagens de *S. sonnei*. Grupos rf (linhagens de *S. flexneri* isoladas em Ribeirão Preto), grupo cf (linhagens de *S. flexneri* isoladas em Campinas), grupos rs (linhagens de *S. sonnei* isoladas em Ribeirão Preto), grupos cs (linhagens de *S. sonnei* isoladas em Campinas).

Tabela 8: Grupos com 100% de similaridade genética obtidos por ERIC-PCR e REP-PCR.

Grupo	Linhagens	Total
rf1	RF2, RF3, RF7, RF21, RF23, RF24, RF25, RF26, RF27, RF28, RF31, RF32, RF34, RF35, RF43, RF44, RF45, RF48, RF54, RF57, RF60, RF63, RF64, RF67	24
rf2	RF53, RF55	2
rf3	RF37, RF56, RF41	3
cf4	CF1A, CF25, CF12B, CF11, CF9, CF7, CF5, CF3, CF1B, CF23, CF21, CF19, CF17, CF15, CF13, CF12C, CF12A, CF10, CF8, CF6, CF12D, CF18, CF4, CF22, CF24, CF26, CF16, CF2, CF14, CF20	30
rf5	RF29, RF47	2
rs6	RS5, RS6, RS72, RS69, RS65, RS61, RS51, RS49, RS70, RS33, RS22, RS16, RS11, RS30, RS68, RS52, RS50, RS25, RS17, RS15, RS10	21
rs7	RS8, RS71, RS46	3
rs8	RS38, RS62	2
cs9	CS1, CS3, CS5, CS20, CS6, CS19B, CS19A, CS18, CS17, CS16I, CS16H, CS16G, CS16F, CS16E, CS16D, CS16C, CS16B, CS16A, CS15, CS14, CS13, CS12, CS11, CS10, CS9, CS8	26
cs10	CS7	1
cs11	CS19C	1
cs12	CS2, CS4	2
rs13	RS9, RS42	2

4.3. Padrão de macro-restrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A partir dos padrões de macro-restrição obtidos, usando o software GelCompar II, foram construídos dois dendrogramas de similaridade genética, um com a análise das

linhagens de *S. sonnei* (figura 6) e outro com a análise das linhagens de *S. flexneri* (figura 7).

Os dados obtidos pela análise de PFGE revelaram a formação de dois grupos principais de similaridade genética tanto para o dendrograma de *S. sonnei* (grupos A e B) (figura 6) quanto para o de *S. flexneri* (grupos C e D) (figura 7). Estes grupos principais (A, B, C e D), se dividem em subgrupos constituídos por linhagens isoladas em ambas as áreas metropolitanas, como acontece com a maior parte deles, ou composto por linhagens isoladas em apenas uma área metropolitana, como é o caso dos subgrupos A2 de *S. sonnei* e o grupo D de *S. flexneri*, que são formados apenas por linhagens isoladas na região de Ribeirão Preto.

As linhagens de *S. sonnei* da região de Campinas foram caracterizadas como sendo a maioria nos grupos A1 (75 %) e B1 (81,25 %). O mesmo pode ser observado para as linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Ribeirão Preto que foram maioria no grupo B2 (83,3 %) (figura 6).

Comparando os grupos genotípicos de *S. sonnei* obtidos por PFGE e ERIC e REP-PCR observa-se que todas as linhagens pertencentes aos grupos B2 (12 linhagens) e A2 (10 linhagens) pertencem também ao grupo rs6 (21 linhagens), exceto as linhagens CS2 e CS4, componentes do grupo B2, que também são as únicas duas linhagens de Campinas, entre as linhagens de Ribeirão Preto deste grupo, sendo as únicas componentes do grupo cs12 (figuras 6, tabelas 8, 10 e 11). As linhagens agrupadas no grupo rs7 (3 linhagens) também foram agrupadas juntas por PFGE no grupo A1 (20 linhagens) (figura 6, tabelas 8 e 11). As linhagens do grupo B1 (16 linhagens) provenientes da região de Campinas foram agrupadas por ERIC-PCR e REP-PCR no grupo cs9 (26 linhagens) (figura 6, tabelas 8 e 10). Treze

das linhagens do grupo A1 provenientes da região de Campinas (15 linhagens desta região) foram agrupadas no clone cs9 e as outras duas linhagens agrupadas nos clones cs10 (CS7) e cs11 (CS19C) (figura 6, tabelas 8 e 10).

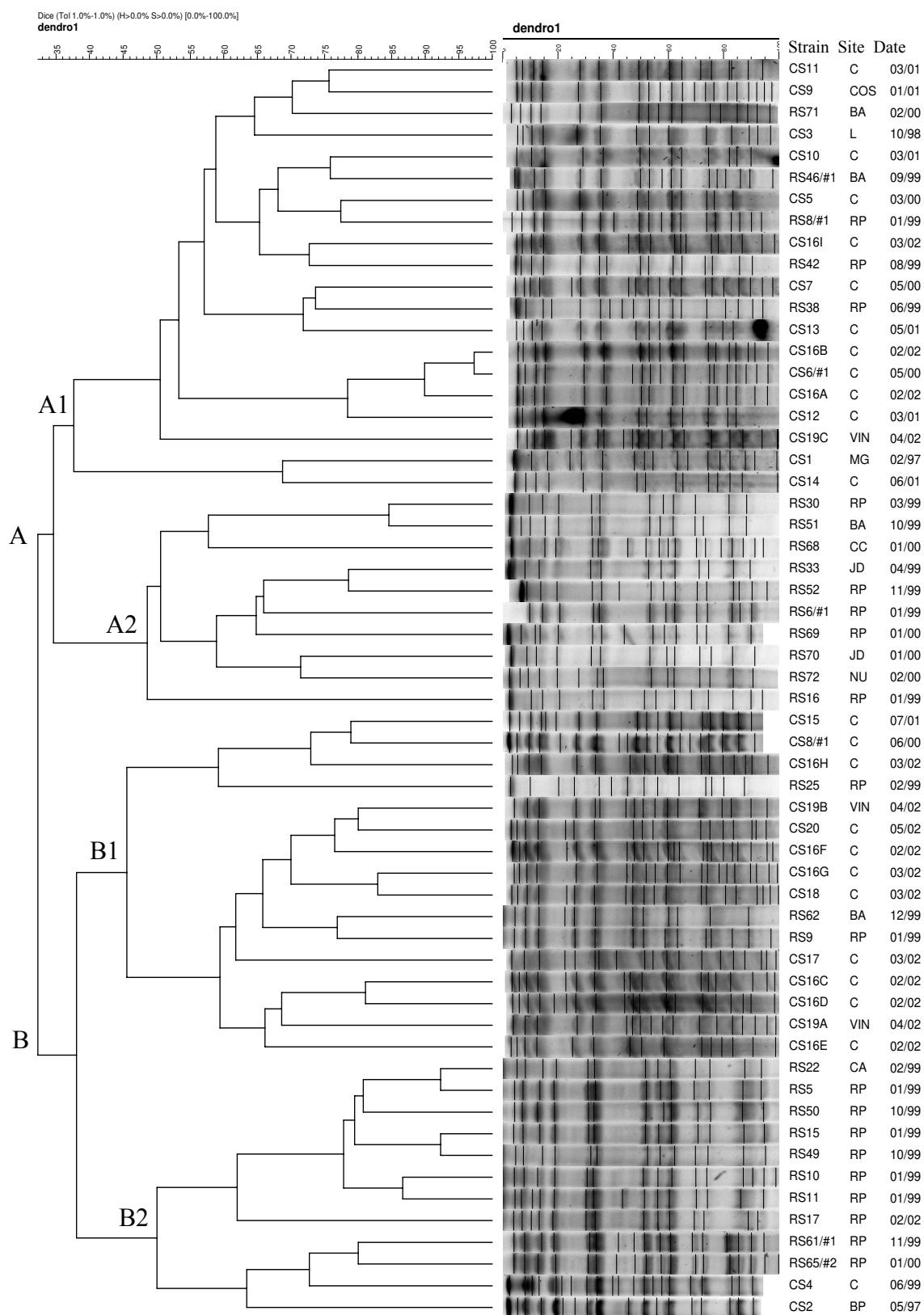


Figura 6: Dendrograma de similaridade por PFGE das linhagens de *S. sonnei* isoladas nas regiões metropolitanas de Campinas (CS) e Ribeirão Preto (RS). Além do nome, as linhagens estão identificadas com a abreviação da cidade de isolamento e data. As linhagens da região de Ribeirão Preto são provenientes das cidades: Jardinópolis (JD), Barrinha (BA), Cambirá (CA), Cássia dos Coqueiros (CC), Nuporanga (NU) e Ribeirão Preto (RP). As linhagens da região de Campinas são provenientes das cidades: Campinas (C), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS) e Vinhedo (VIN).

Os grupos C1 e C2 de *S. flexneri* são compostos por linhagens provenientes de ambas as regiões, sendo C1 composto principalmente por linhagens de Ribeirão Preto (66,7%) e C2 composto principalmente por linhagens de Campinas (77,4%). As linhagens do grupo C3 foram em sua maioria isoladas na região de Ribeirão Preto (90%) e as do grupo D isoladas principalmente na região de Ribeirão Preto (figura 7).

Pela análise dos grupos genotípicos de *S. flexneri* obtidos por PFGE, ERIC-PCR e REP-PCR foi observado que todas as linhagens dos grupos D e C2 provenientes da região de Ribeirão Preto, pertencem ao grupo rf1 (figura 7, tabelas 8 e 12). As duas únicas linhagens do grupo rf2 foram agrupadas por PFGE no grupo C3. As linhagens dos grupos rf3 e rf5, foram agrupadas por PFGE nos grupos C1 e C3. Os genótipos agrupados nos grupos rf2, rf3 e rf5 foram isolados apenas na cidade de Ribeirão Preto (figura 7, tabelas 8 e 12). A maior parte das linhagens do grupo cf4 (30 linhagens) foi agrupada por PFGE no grupo C2, sendo as linhagens CF13, CF14, CF5, CF1B agrupadas no grupo C1 e a linhagem CF24 agrupada no grupo C3 (figura 7, tabelas 8 e 9).

A linhagem CS7, única representante do genótipo cs10, que tem alta similaridade com o grupo cs9 (26 linhagens), é uma das duas únicas linhagens que não apresentaram o

integron 1 (como será discutido posteriormente), foi agrupada por PFGE no grupo A1, com várias outras linhagens do grupo cs9, e isolada de um paciente com 87 anos de idade (tabela 10). Dos 119 casos de shiguelose, apenas 2 acometeram indivíduos com mais de 50 anos de idade. Os resultados obtidos pelos métodos de ERIC e REP-PCR e pela análise do perfil de integrons demonstraram que a linhagem CS7 possui um genótipo bem particular entre os demais, inclusive por ser responsável pela infecção do indivíduo com idade mais avançada entre os 119 casos estudados.

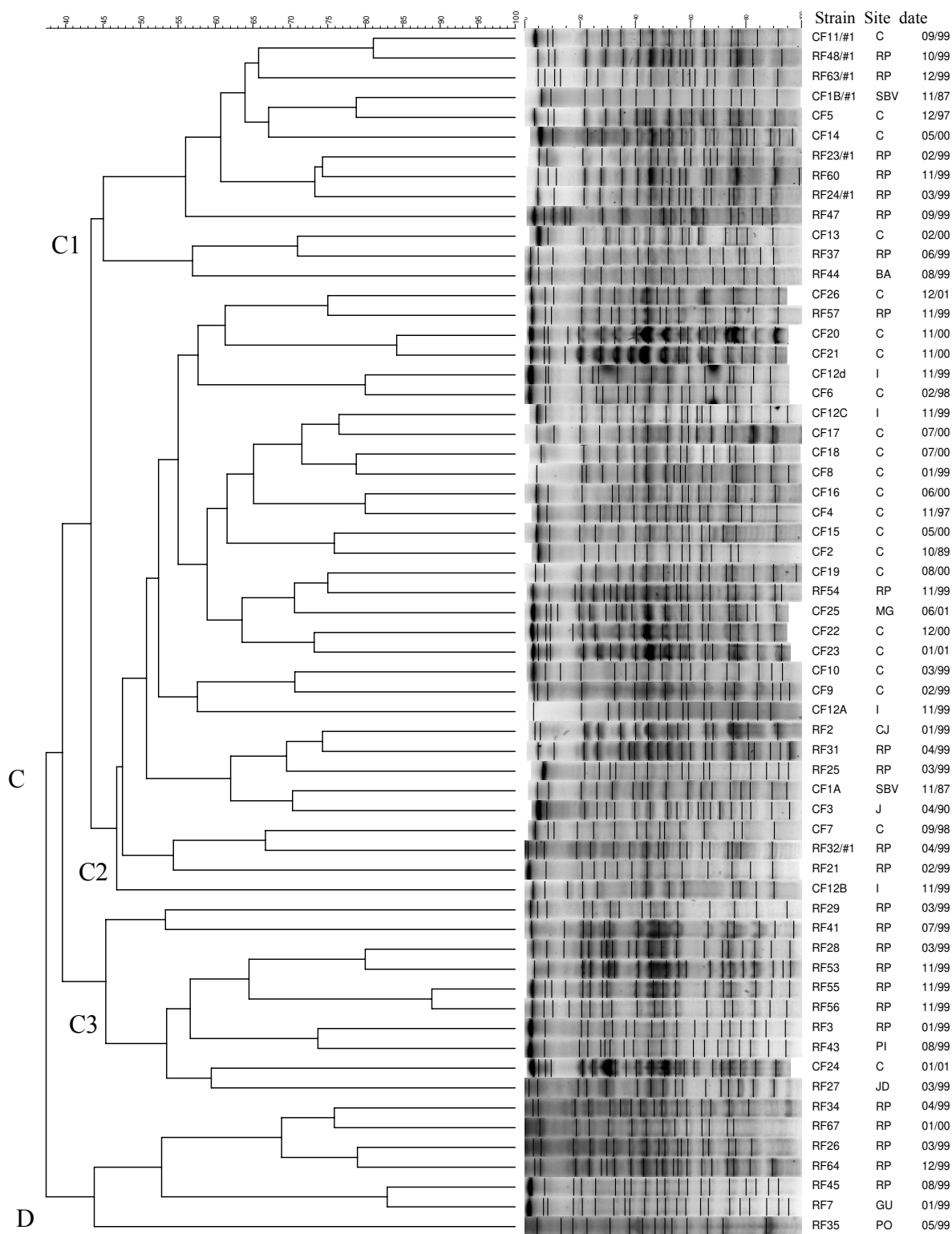


Figura 7: Dendrograma de similaridade por PFGE das linhagens de *S. flexneri* isoladas nas regiões metropolitanas de Campinas (CF) e Ribeirão Preto (RF). Além do nome, as linhagens estão identificadas com a abreviação da cidade de isolamento e data. As linhagens da região de Ribeirão Preto são provenientes das cidades: Cajuru (CJ), Guataporã (GU), Jardinópolis (JD), Pontal (PO), Pitangueiras (PI), Barrinha (BA) e Ribeirão Preto (RP). As linhagens da região de Campinas são provenientes das cidades: São João da Boa Vista (SBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I) e Mogi Guaçu (MG).

Tabela 9: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. flexneri* (CF) isoladas na região metropolitana de Campinas e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.

<i>S. flexneri</i>	Data do Isolamento	Cidade	Idade	Resistência antimicrobiana	Clone PFGE	Clone ERIC/REP
CF1A	02/11/87	SJBV	44	AP, ET, SUT	C2	cf4
CF1B	02/11/87	SJBV	12	AP, ET, SUT	C1	cf4
CF2	03/10/89	C	2	CO, ET, SUT, TT	C2	cf4
CF3	23/04/90	J	35	ET, SUT	C2	cf4
CF4	24/11/97	C	8m	AP, CO, ET, SFT,TT	C2	cf4
CF5	30/12/97	C	6m	AP, CO, ET, SFT,TT	C1	cf4
CF6	11/02/98	C	2	AP, CO, ET, SFT,TT	C2	cf4
CF7	16/09/98	C	4	AP, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF8	21/01/99	C	1	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF9	17/02/99	C	70	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF 10	29/03/99	C	29	CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF11	30/09/99	C	11m	AP, CO, ET, SUT,TT	N	cf4
CF12A	12/11/99	I	50	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF12B	12/11/99	I	40	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF12C	16/11/99	I	4	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF12D	30/11/99	I	19	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF13	14/02/00	C	8m	AP, CO, ET, SUT,TT	C1	cf4
CF14	02/05/00	C	5	AP, CO, ET, SUT,TT	C1	cf4
CF15	15/05/00	C	3	AP, CF,CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF16	05/06/00	C	4	AP, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF17	10/07/00	C	6m	AP, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF18	10/07/00	C	-	AP, ET,TT	C2	cf4
CF19	15/08/00	C	1,5	AP, CO, ET, SUT,TT	C2	cf4
CF20	10/11/00	C	5	AP, CO, TT	C2	cf4
CF21	14/11/00	C	50	AP, CO, SUT, TT	C2	cf4
CF22	21/12/00	C	5	AP, CO, ET, SUT, TT	C2	cf4
CF23	16/01/01	C	40	AP, CO, ET, SUT, TT	C2	cf4
CF24	22/01/01	C	10m	ET, TT	C3	cf4
CF25	18/06/01	MG	49	SUT	C2	cf4
CF26	27/12/01	C	3	AP, CO, TT	C2	cf4

Cidades da região de Campinas: São João da Boa Vista (SJBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS), Vinhedo (VIN). Antimicrobianos: AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina.

Tabela 10: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. sonnei* (CS) isoladas na região metropolitana de Campinas e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.

<i>S. sonnei</i>	Data do Isolamento	Cidade	Idade	Resistência antimicrobiana	Clone PFGE	Clone ERIC/REP
CS1	14/02/97	MG	23	ET, SUT, TT	A1	cs9
CS2	14/05/97	BP	15	AP, ET, SUT	B2	cs12
CS3	15/10/98	L	11	ET, SUT, TT	A1	cs9
CS4	24/06/99	C	10	SUT, TT	B2	cs12
CS5	10/03/00	C	2	AP, SUT, TT	A1	cs9
CS6	23/05/00	C	7m	ET, SUT, TT	A1	cs9
CS7	31/05/00	C	87	ET, SUT, TT	A1	cs10
CS8	02/06/00	C	2	ET, SUT, TT	B1	cs9
CS9	25/01/01	COS	2	SUT, TT	A1	cs9
CS10	02/03/01	C	9	ET, SUT, TT	A1	cs9
CS11	02/03/01	C	3	SUT, TT	A1	cs9
CS12	08/03/01	C	3	ET, SUT, TT	A1	cs9
CS13	10/05/01	C	1	SUT, TT	A1	cs9
CS14	29/06/01	C	-	SUT, TT	A1	cs9
CS15	05/07/01	C	-	SUT, TT	B1	cs9
CS16A	28/02/02	C	4	SUT, TT	A1	cs9
CS16B	28/02/02	C	3	SUT, TT	A1	cs9
CS16C	28/02/02	C	5	SUT, TT	B1	cs9
CS16D	28/02/02	C	4	SUT, TT	B1	cs9
CS16E	28/02/02	C	5	SUT, TT	B1	cs9
CS16F	28/02/02	C	-	SUT, TT	B1	cs9
CS16G	07/03/02	C	6	SUT, TT	B1	cs9
CS16H	11/03/02	C	42	SUT, TT	B1	cs9
CS16I	26/03/02	C	6	SUT, TT	A1	cs9
CS17	06/03/02	C	5	SUT, TT	B1	cs9
CS18	15/03/02	C	-	SUT, TT	B1	cs9
CS19A	18/04/02	VIN	-	SUT, TT	B1	cs9
CS19B	18/04/02	VIN	-	SUT, TT	B1	cs9
CS19C	18/04/02	VIN	-	SUT, TT	A1	cs11
CS20	03/05/02	C	-	SUT, TT	B1	cs9

Cidades da região de Campinas: São João da Boa Vista (SJBV), Campinas (C), Jundiaí (J), Itapira (I), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS), Vinhedo (VIN). Antimicrobianos: AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina.

Tabela 11: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. sonnei* (RS) isoladas na região metropolitana de Ribeirão Preto e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.

<i>S. sonnei</i>	Data do isolamento	Cidade	Idade	Resistência antimicrobiana	Clone PFGE	Clone ERIC/REP
RS5	11/01/99	RP	6.5	SUL	B2	rs6
RS6	18/01/99	RP	3	AP, CF, SUL	A2	rs6
RS8	19/01/99	RP	14	SUL, TT	A1	rs7
RS9	21/01/99	RP	5	CF, SUL, TT	B1	rs13
RS10	21/01/99	RP	11.5	AP, CF, SUL, TOB	B2	rs6
RS11	21/01/99	RP	6	AP, CF, SUL	B2	rs6
RS15	25/01/99	RP	5.5	-	B2	rs6
RS16	26/01/99	RP	5	SUL, TT	A2	rs6
RS17	02/02/99	RP	1	-	B2	rs6
RS22	22/02/99	CA	41	-	B2	rs6
RS25	22/02/99	RP	-	N	B1	rs6
RS30	31/03/99	RP	5	AP, SUL	A2	rs6
RS33	08/04/99	JD	10m	-	A2	rs6
RS38	18/06/99	RP	5	SUL, TT	A1	rs8
RS42	09/08/99	RP	9m	SUL, TT	A1	rs13
RS46	15/09/99	BA	2	SUL, TT	A1	rs7
RS49	22/10/99	RP	3	-	B2	rs6
RS50	22/10/99	RP	5	AP, SUL	B2	rs6
RS51	29/10/99	BA	5	SUL, TT	A2	rs6
RS52	02/11/99	RP	4	AP, SUL	A2	rs6
RS61	25/11/99	RP	2m	AP, SUL	B2	rs6
RS62	04/12/99	BA	4m	SUL, TT	B1	rs8
RS65	10/01/00	RP	6.5	AP, SUL	B2	rs6
RS68	19/01/00	CC	5	AP, SUL	A2	rs6
RS69	27/01/00	RP	7	AP, SUL	A2	rs6
RS70	28/01/00	JD	4m	AP, SUL	A2	rs6
RS71	07/02/00	BA	3	AP, SUL, TT	A1	rs7
RS72	08/02/00	NU	2	N	A2	rs6

Cidades da região de Ribeirão Preto: Cajuru (CJ), Guataporá (GU), Jardinópolis (JD), Pontal (PO), Pitangueiras (PI), Barrinha (BA), Ribeirão Preto (RP), Cambirá (CA), Cássia dos Coqueiros (CC) e Nuporanga (NU). Antimicrobianos: Cloranfenicol (CO), Amicacina (AMI), Ampicilina (AP), Cefalotina (CF), Cefoxitina (CFX), Gentamicina (GEN), Sulfonamida (SUL), Tetraciclina (TT), Tobramicina (TOB), Ácido nalidíxico (NAL).

Tabela 12: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade, idade do paciente, perfil de resistência a antimicrobianos de *S. flexneri* (RF) isoladas na região metropolitana de Ribeirão Preto e respectivos clones a que pertencem pelas análises de PFGE e ERIC e REP-PCR.

<i>S. flexneri</i>	Data de isolamento	Cidade	Idade	Resistência antimicrobiana	Clone PFGE	Clone ERIC/REP
RF02	04/01/99	CJ	48	AMI, AP, CO, GEN, SUL, TT, TOB	C2	rf1
RF03	06/01/99	RP	1.5	N	C3	rf1
RF07	18/01/99	GU	7m	SUL, TT	D	rf1
RF21	09/02/99	RP	21	AP, CO, SUL, TT	C2	rf1
RF23	23/02/99	RP	1m	SUL	C1	rf1
RF24	10/03/99	RP	3.5	AP, CO, SUL, TT	C1	rf1
RF25	15/03/99	RP	3.5	AP, CO, SUL, TT	C2	rf1
RF26	15/03/99	RP	1.5	AP, SUL, TT	D	rf1
RF27	15/03/99	JD	6m	SUL, TT	C3	rf1
RF28	24/03/99	RP	9m	SUL, TT	C3	rf1
RF29	24/03/99	RP	8m	SUL, TT	C3	rf5
RF31	02/04/99	RP	4m	AP, SUL	C2	rf1
RF32	07/04/99	RP	20	AP, CO, SUL, TT, TOB	C2	rf1
RF34	09/04/99	RP	4m	AP, CO, SUL, TT	D	rf1
RF35	07/05/99	PO	4	SUL, TT	D	rf1
RF37	14/06/99	RP	9m	SUL, TT	C1	rf3
FR41	09/07/99	RP	6m	AP, SUL, TT	C3	rf3
RF43	08/09/99	PI	2	SUL, TT	C3	rf1
RF44	16/08/99	BA	9m	AP, CO, GEN, SUL, TT, TOB	C1	rf1
RF45	20/08/99	RP	3	AP, CO, TT	D	rf1
RF47	15/09/99	RP	16	AP, SUL, TT	C1	rf5
RF48	13/10/99	RP	9m	AP, CO, SUL, TT	C1	rf1
RF53	03/11/99	RP	26	TT	C3	rf2
RF54	04/11/99	RP	7m	AP, SUL, TT	C2	rf1
RF55	08/11/99	RP	10m	SUL, TT	C3	rf2
RF56	13/11/99	RP	3	SUL, TT	C3	rf3
RF57	19/11/99	RP	11m	AP, SUL, TT	C2	rf1
RF60	25/11/99	RP	9m	AP, SUL	C1	rf1
RF63	30/12/99	RP	2	AP, SUL, TT	C1	rf1
RF64	30/12/99	RP	27	AP, CO, SUL, TT	D	rf1
RF67	18/01/00	RP	5m	SUL, TT	D	rf1

Cidades da região de Ribeirão Preto: Cajuru (CJ), Guataporá (GU), Jardinópolis (JD), Pontal (PO), Pitangueiras (PI), Barrinha (BA), Ribeirão Preto (RP), Cambirá (CA), Cássia dos Coqueiros (CC) e Nuporanga (NU). Antimicrobianos: Cloranfenicol (CO), Amicacina (AMI), Ampicilina (AP), Cefalotina (CF), Cefoxitina (CFX), Gentamicina (GEN), Sulfonamida (SUL), Tetraciclina (TT), Tobramicina (TOB), Ácido nalidíxico (NAL).

4.4. PCR em Tempo Real de linhagens de *S. sonnei*

A análise da presença dos genes *int1*, *int2* e *int3* por PCR em tempo real foi feita para 25 linhagens de *S. sonnei* isoladas na região de Campinas (tabela 13).

O sinal de amplificação para a sequência *int1* foi registrado entre os ciclos 20 e 25 e demonstrou um sinal consistente até o ciclo 50 para todas as linhagens de *S. sonnei* testadas, exceto CS7 e CS16C, que não demonstraram um sinal significativo (figura 8). Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, onde todas as linhagens exibiram bandas de aproximadamente 183 pb, exceto as linhagens CS7 e CS16C, confirmando o resultado de PCR em tempo real e indicando a presença de *int1* em 23 das 25 linhagens (figura 9, tabela 13).

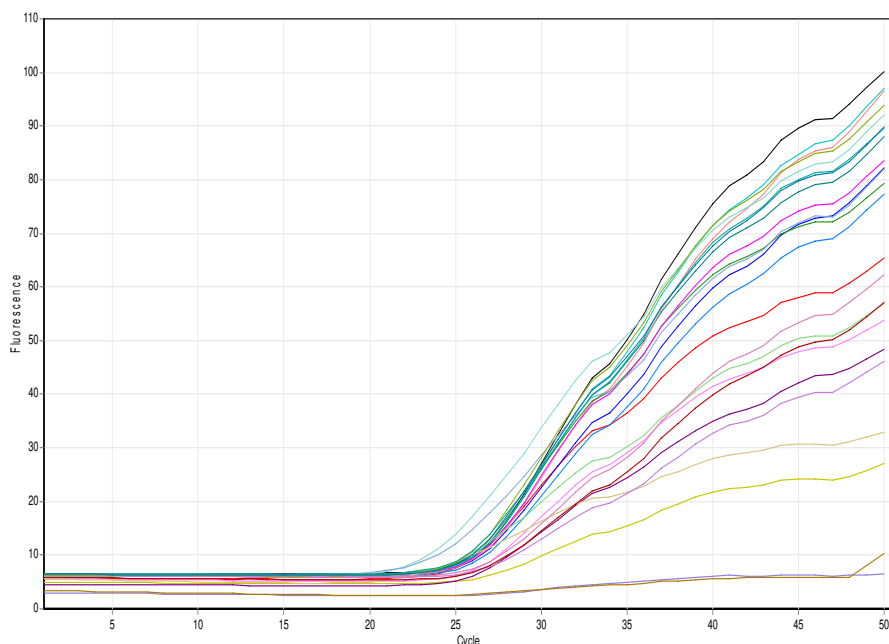


Figura 8: Resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de *S. sonnei* testadas para o gene *int1*. De cima para baixo: CS4, CS16H, CS12, CS2, CS20, CS5, CS19B, CS17, CS6, CS16A, CS16D, CS16B, CS19A, CS18, CS16G, CS8, CS11, CS16I, CS1, CS3, CS14, CS16E, CS9, CS7 e CS16C. Eixo X: Ciclo; Eixo Y: Fluorescência.

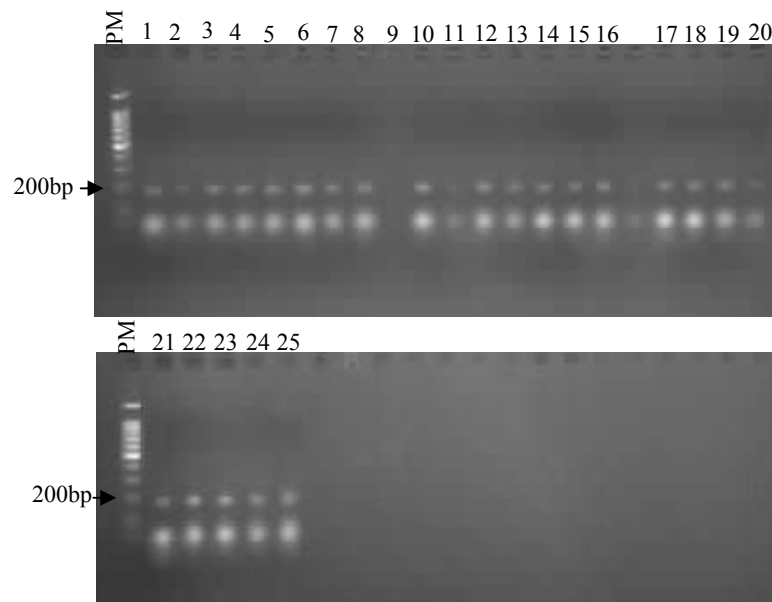


Figura 9: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 1. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão arranjadas e numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. Todas as linhagens apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 183 pb, a não ser as linhagens CS7 (9) e CS16C (11).

Entre as 25 linhagens de *S. sonnei* testadas para presença de *int2*, 22 registraram sinais de amplificação entre os ciclos 10 e 15, 3 linhagens entre os ciclos 25 e 30. Todas apresentaram sinal consistente que terminou entre os ciclos 25 e 45 (figura 10). Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, onde todas as linhagens exibiram bandas de aproximadamente 207 pb, confirmando a presença de *int2* em todas as linhagens (figura 11, tabela 13).

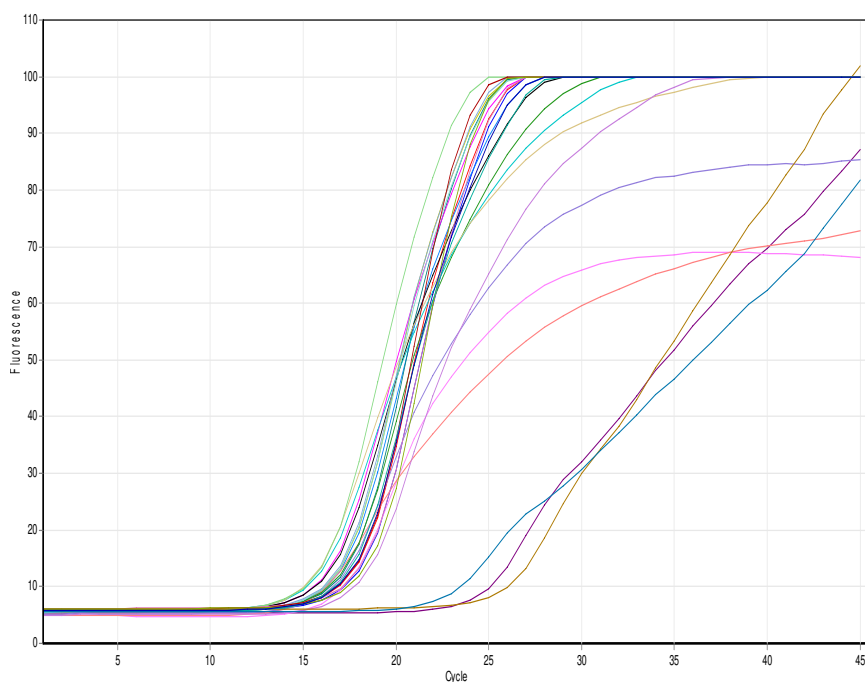


Figura 10: Demonstração do resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de *S. sonnei* testadas para o gene *int2*. Da esquerda para direita: CS16H, CS18 CS12, CS2, CS20, CS7, CS16A, CS5, CS19B, CS16C CS17, CS6, CS4 CS16D, CS16B, CS19A, CS16G, CS8, CS11, CS16I, CS1, CS3, CS14, CS16E e CS9. Eixo X: Ciclo; Eixo Y: Fluorescência.

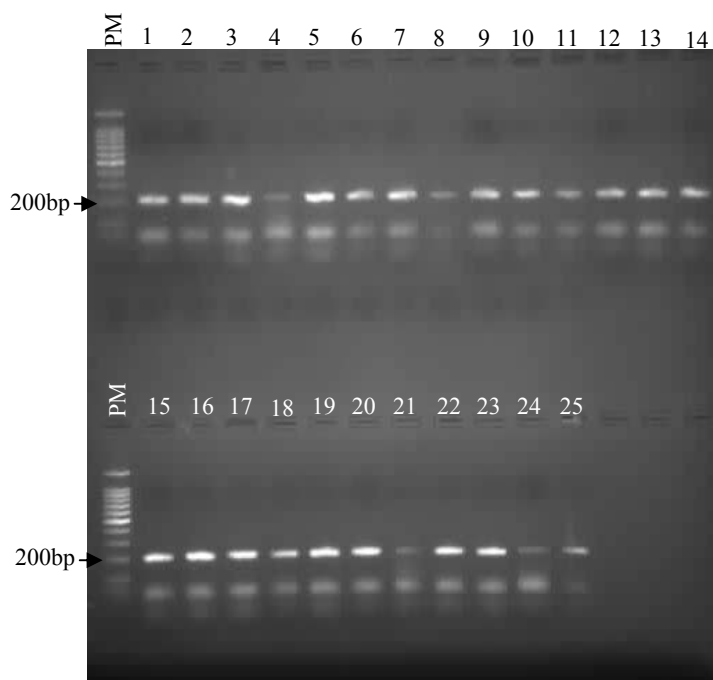


Figura 11: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 2. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão arranjadas e numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. Todas as linhagens apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 207 pb.

As 25 linhagens de *S. sonnei* foram testadas para a presença de *int3* por PCR em tempo real e todas registraram sinal consistente que se iniciou entre os ciclos 30 e 35 e se elevou até o ciclo 45 (figura 12). Os sinais detectados apenas depois do trigésimo ciclo são considerados normalmente resultados “falso positivo”. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, onde 12 amostras demonstraram bandas com aproximadamente 155 pb. As outras 13 amostras (CS4, CS16H, CS12, CS17, CS16A, CS16D, CS18, CS16G, CS8, CS11, CS16I, CS1 e CS9) não produziram a mesma banda (figura 13, tabela 13), sendo consideradas negativas para a presença deste integron.

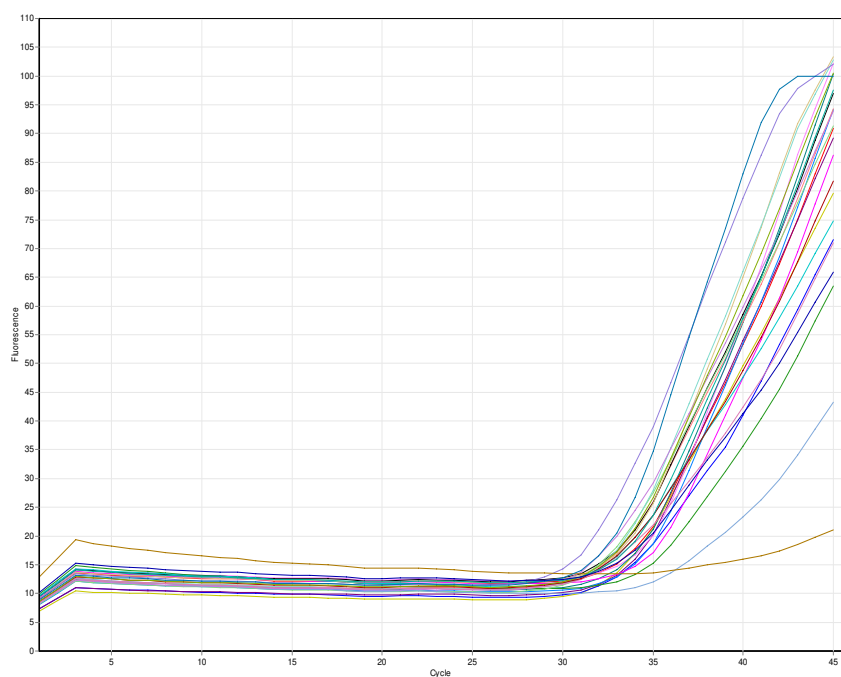


Figura 12: Demonstração do resultado de PCR em tempo real das 25 linhagens de *S. sonnei* testadas para o gene *int3*. De cima para baixo: CS12, CS2, CS20, CS4, CS9, CS19B, CS17, CS6, CS16H, CS16A, CS8, CS16D, CS19A, CS16G, CS16I, CS1, CS3, CS5, CS14, CS16E, CS7, CS16C, CS18, CS16B e CS11. Eixo X: Ciclo; Eixo Y: Fluorescência.

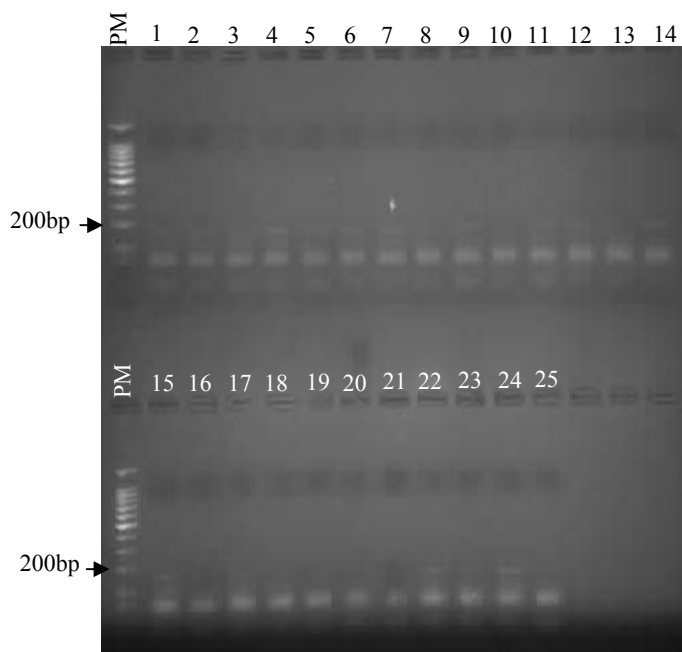


Figura 13: Gel de agarose (2%) demonstrando os fragmentos amplificados por PCR do Integron 3. Padrão de peso molecular 100 pb. As linhagens estão numeradas de acordo com a numeração apresentada na tabela 6. As linhagens CS2 (4), CS3 (22), CS5 (6), CS6 (12), CS7 (9), CS14 (23), CS16B (14), CS16C (11), CS16E (24), CS19A (15), CS19B (7) e CS20 (5), apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 155 pb e as linhagens CS4 (1), CS16H (2), CS12 (3), CS17 (8), CS16A (10), CS16D (13), CS18 (16), CS16G (17), CS8 (18), CS11 (19), CS16I (20), CS1 (21) e CS9 (25), não apresentaram a amplificação do mesmo fragmento.

Comparando o perfil de integrons e o perfil de resistência a antimicrobianos apresentados pelas linhagens, podemos notar que todas as linhagens (100%) testadas são resistentes ao sulfametoxazol (SUT) e tetraciclina (TT), 6 linhagens (24%) apresentaram resistência à estreptomicina (ET) e 2 linhagens (8%) apresentaram resistência à ampicilina (AP). Todas as linhagens são totalmente suscetíveis ao cloranfenicol (CO), sulfazotrin (SFT) e cefalotina (CF). Sessenta por cento das linhagens estudadas apresentaram perfil de

resistência a antimicrobianos idêntico a partir de 2001, exceto a linhagem CS12. Além da resistência a SUT e TT, a maior parte das linhagens isoladas até o ano 2000 apresentaram resistência a um terceiro antimicrobiano, sendo estreptomicina (ET) o mais freqüente (tabela 13).

Entre as vinte e cinco linhagens de *S. sonnei* analisadas, vinte e três (92%) demonstraram a presença do integron de classe 1. O integron de classe 2 foi detectado em todas (100%) as linhagens pesquisadas e o integron de classe 3 foi detectado em 12 (48%) linhagens (tabela 13).

Tabela 13: Identificação da linhagem, data de isolamento, cidade de isolamento, idade do paciente, presença dos integrons (*int1*, *int2* e *int3*), perfil de resistência a antimicrobianos, clones a que pertencem pelos métodos de PFGE e ERIC/REP-PCR e número correspondente às 25 linhagens de *S. sonnei* nos géis de agarose das figuras (9, 11 e 13).

Linhagem	Data do Isolamento	Cidade	Idade	Int1	Int2	Int3	Resistência antimicrobiana	Clone PFGE	Clone eric/rep	Número no gel
CS1	14/02/97	MG	23	+	+	-	ET, SUT, TT	A1	cs9	21
CS2	14/05/97	BP	15	+	+	+	AP, ET, SUT	B2	cs12	4
CS3	15/10/98	L	11	+	+	+	ET, SUT, TT	A1	cs9	22
CS4	24/06/99	C	10	+	+	-	SUT, TT	B2	cs12	1
CS5	10/03/00	C	2	+	+	+	AP, SUT, TT	A1	cs9	6
CS6	23/05/00	C	7m	+	+	+	ET, SUT, TT	A1	cs9	12
CS7	31/05/00	C	87	-	+	+	ET, SUT, TT	A1	cs10	9
CS8	02/06/00	C	2	+	+	-	ET, SUT, TT	B1	cs9	18
CS9	25/01/01	COS	2	+	+	-	SUT, TT	A1	cs9	25
CS10	02/03/01	C	9	N	N	N	ET, SUT, TT	A1	cs9	N
CS11	02/03/01	C	3	+	+	-	SUT, TT	A1	cs9	19
CS12	08/03/01	C	3	+	+	-	ET, SUT, TT	A1	cs9	3
CS13	10/05/01	C	1	N	N	N	SUT, TT	A1	cs9	N
CS14	29/06/01	C	N	+	+	+	SUT, TT	A1	cs9	23
CS15	05/07/01	C	N	N	N	N	SUT, TT	B1	cs9	N
CS16A	28/02/02	C	4	+	+	-	SUT, TT	A1	cs9	10
CS16B	28/02/02	C	3	+	+	+	SUT, TT	A1	cs9	14
CS16C	28/02/02	C	5	-	+	+	SUT, TT	B1	cs9	11
CS16D	28/02/02	C	4	+	+	-	SUT, TT	B1	cs9	13
CS16E	28/02/02	C	5	+	+	+	SUT, TT	B1	cs9	24
CS16F	28/02/02	C	N	N	N	N	SUT, TT	B1	cs9	N
Cs16G	07/03/02	C	6	+	+	-	SUT, TT	B1	cs9	17
CS16H	11/03/02	C	42	+	+	-	SUT, TT	B1	cs9	2
CS16I	26/03/02	C	6	+	+	-	SUT, TT	A1	cs9	20
CS17	06/03/02	C	5	+	+	-	SUT, TT	B1	cs9	8
CS18	15/03/02	C	N	+	+	-	SUT, TT	B1	cs9	16
CS19A	18/04/02	VIN	N	+	+	+	SUT, TT	B1	cs9	15
CS19B	18/04/02	VIN	N	+	+	+	SUT, TT	B1	cs9	7
CS19C	18/04/02	VIN	N	N	N	N	SUT, TT	A1	cs11	N
CS20	03/05/02	C	N	+	+	+	SUT, TT	B1	cs9	5

Cidades da região de Campinas: Campinas (C), Itapira (I), Mogi Guaçu (MG), Bragança Paulista (BP), Limeira (L), Cosmópolis (COS), Vinhedo (VIN).

Antimicrobianos testados: AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina. Outras abreviações: N= não avaliado, m = meses, + = presente, - = ausente, Int = Integron.

4.5. Seqüenciamento de DNA

Os integrons de quatro linhagens de *S. sonnei* da região de Campinas, escolhidas ao acaso (CS18, CS16I, CS11 e CS1), foram seqüenciados. O DNA proveniente das reações de PCR foi purificado, e seqüenciado para verificação da presença dos genes *int1* nas linhagens CS16I, CS11 e CS1, *int2* nas linhagens CS18, CS16I, CS11 e CS1, e *int3* nas linhagens CS18, CS16I e CS1. O resultado do seqüenciamento de DNA confirmou a presença dos genes *int1*, *int2* e a ausência de *int3* nas linhagens pesquisadas.

5. Discussão

O Estado de São Paulo é a área mais industrializada do Brasil e a região de Campinas, uma das mais ricas do Estado, que, apesar de apresentar desigualdades sociais, também apresenta um dos melhores padrões de vida do país. Campinas é um centro tecnológico e industrial onde, em toda região metropolitana, vivem cerca de 2,6 milhões de pessoas. Assim como outras grandes cidades e regiões metropolitanas, Campinas apresenta em sua periferia favelas e locais com problemas de infra-estrutura. Na região de Ribeirão Preto vivem 560 mil pessoas e estima-se que em toda região metropolitana vivam mais de 1 milhão de pessoas. Ribeirão Preto é um centro agro industrial de nível sócio econômico elevado. Estas duas regiões atraem pessoas de áreas vizinhas e de outras regiões do país por motivos de estudo, profissionais ou comerciais, o que favorece a disseminação de doenças infecciosas nestas localidades (IBGE).

A análise dos casos de shigelose estudados no presente trabalho revelou uma alta ocorrência entre crianças de até cinco anos de idade (57,9% das infecções por *S. sonnei* e 64,4% das infecções por *S. flexneri*). Este fato está provavelmente associado a uma maior fragilidade imunológica apresentada pelas crianças, com o sistema imune ainda em formação, além de fatores como a qualidade da alimentação e duração do período de amamentação (figura 2, tabelas 9, 10, 11 e 12). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em trabalhos anteriores, já que as shigeloses são consideradas uma importante causa de morte de crianças menores de 5 anos, principalmente em países em desenvolvimento (Schroeder e Hilbi, 2008). Em um estudo realizado na cidade de São Paulo, as shigeloses corresponderam a 16% entre os casos de diarreia em crianças, das quais 9% foram causadas por *S. flexneri* e 6% por *S. sonnei* (Sobel *et al.*, 2004). Medeiros

et al. (2001), caracterizando os principais enteropatógenos causadores de diarreia na região de Ribeirão Preto, analisaram 1836 amostras de fezes, nas quais *Shigella* revelou ser o segundo mais freqüente agente etiológico isolado em crianças com menos de 2 anos de idade. Em uma área de baixa condição socioeconômica do Chile, foi observado que crianças têm 67% de chances de serem acometidas por shigelose nos primeiros cinco anos de vida (Ferrecio *et al.*, 1991).

A shigelose endêmica é caracterizada por uma alta incidência na infância, principalmente entre crianças de até 5 anos de idade (Shears, 1996; Kotloff *et al.*, 1999). Estes dados são corroborados pelos observados neste trabalho, uma vez que a maioria dos novos casos, ao longo dos anos estudados, ocorreram, principalmente, em crianças com menos de cinco anos de idade.

Observando a época do ano em que ocorreram os casos de shigelose aqui analisados, foi verificada uma aparente variação sazonal de isolamento das linhagens, com predomínio de casos no verão, período mais chuvoso, apesar disso, também foi observado um grande número de infecções durante as outras estações do ano (figura 3, tabela 7). Entre as 119 linhagens pesquisadas, 33 linhagens de *S. sonnei* e 20 linhagens de *S. flexneri* foram isoladas durante o verão. Este aparente padrão sazonal pode ser explicado pelo fato de que a falta de condições de saneamento básico e o excesso de chuvas nesse período, possa facilitar o contato de água contaminada com água potável e alimentos, possibilitando a transmissão de patógenos. A distribuição sazonal na ocorrência das shigeloses é comumente observada em áreas endêmicas (Shears, 1996).

Jones *et al.* (2004) não observaram variação sazonal na ocorrência de shigeloses entre soldados na Amazônia peruana e Ram *et al.* (2008), analisando 32 estudos sobre a ocorrência de *Shigella*, não conseguiram determinar um padrão sazonal claro para a

ocorrência da doença. A dificuldade de determinar um padrão sazonal nos casos descritos pode ser devido ao fato: de muitos estudos compreenderem períodos inferiores a dois anos; de se utilizarem de intervalos de tempo não padronizados, incluindo meses do ano, quartos de ano, ou termos mais vagos como “estação das chuvas” e “estação de seca”; além das diferentes características observadas entre os hemisférios norte e sul do planeta (Ram *et al.*, 2008).

Analisando os resultados obtidos pelos métodos de ERIC-PCR e REP-PCR foi observado um agrupamento, nos grupos X e Y, em relação ao local de isolamento, com exceção dos sub grupos rf5 e rs13 (figura 5, tabela 8). Este agrupamento em relação à região de isolamento sugere que estes genótipos não tenham sido transmitidos entre as duas regiões durante o período analisado.

Certos genótipos foram mais preservados, como observado nos grupos rf1 (24 linhagens) e cf4 (30 linhagens), representando, provavelmente, genótipos melhor sucedidos e melhor adaptados às pressões evolutivas características de determinada cidade ou região, durante aquele período. Um quadro similar foi observado para o grupo Y (*S. sonnei*), onde os genótipos dos grupos rs6 e cs9 apresentaram um número de linhagens superior aos outros grupos desta espécie (tabela 8).

Os grupos rs7 e rs8 apresentam uma alta similaridade genética (mais de 90%). Além disso, as linhagens RS71, RS46 e RS62 foram isoladas na cidade de Barrinha, sendo estas, 3 das únicas 4 linhagens isoladas nesta cidade (figura 5, tabela 11). Nestes grupos foi observado um agrupamento em relação à cidade de isolamento, o que sugere que este genótipo tenha estado presente apenas nas cidades de Barrinha e Ribeirão Preto.

A maior parte dos genótipos, aqui estudados, foram isolados de pacientes provenientes das cidades de Ribeirão Preto e Campinas. Isto é compreensível já que estas

são as cidades centrais das regiões metropolitanas, onde vive a maior parte das pessoas e para onde muitas pessoas de toda região vão para tratamentos de saúde. Além disso, nos vários grupos genotípicos provenientes da região metropolitana de Ribeirão Preto identificados por ERIC e REP-PCR, o primeiro isolamento foi feito na cidade de Ribeirão Preto e, posteriormente, em outras cidades da região, a não ser para o clone *rfl1*, sugerindo que estes genótipos tenham sido disseminados da cidade central para as cidades periféricas desta região. Este provável padrão de origem das linhagens infecciosas na principal cidade da região metropolitana, não foi verificado na região de Campinas (tabelas 9, 10, 11 e 12).

Analisando o dendrograma obtido pelos métodos de ERIC e REP-PCR é possível identificar alguns grupos de identidade entre as linhagens isoladas em ambas as regiões, ou seja, alguns grupos genotípicos, que foram responsáveis pelos casos de shigelose nas duas regiões estudadas, presentes durante o período analisado (figura 5).

Os resultados obtidos pela análise do perfil de macro-restrição (PFGE) para o grupo A2, onde todas as linhagens de *S. sonnei* foram provenientes da região metropolitana de Ribeirão Preto, indicam que não houve transmissão destas linhagens entre as duas regiões metropolitanas. Já os grupos A1, B1, e B2, que tiveram as linhagens oriundas principalmente de uma ou de outra região metropolitana, indicam a possibilidade de transmissibilidade entre as duas regiões (figura 6).

No dendrograma construído a partir da análise do perfil de macrorestrição (PFGE) para as linhagens de *S. flexneri*, o grupo D foi composto exclusivamente por linhagens de Ribeirão Preto, indicando que não houve transmissão destas linhagens entre as duas regiões metropolitanas. Os grupos C1, C2 e C3, em que as linhagens de uma ou de outra região metropolitana foram maioria, indicam a possibilidade de transmissibilidade entre as duas regiões (figura 7).

O fato observado de que no grupo B1 (*S. sonnei*) três das linhagens de Ribeirão Preto terem sido isoladas em 1999 e todas as demais do mesmo grupo, pertencentes à região metropolitana de Campinas, terem sido isoladas em datas posteriores a esta (1999), indica uma possível transmissão destas linhagens para a região de Campinas (figura 6).

Dados semelhantes foram obtidos para as linhagens de *S. flexneri*, o que pode ser observado no grupo C3, em que CF24 foi a única linhagem isolada em 2001 e proveniente de Campinas e todas as demais do mesmo grupo, pertencentes à região metropolitana de Ribeirão Preto, terem sido isoladas em 1999, indicando uma possível transmissão destas linhagens para a região de Ribeirão Preto (figura 7).

Estes dados, obtidos tanto para o dendrograma das linhagens de *S. sonnei* tanto para o dendrograma das linhagens de *S. flexneri*, sugerem que algumas linhagens permaneceram restritas em uma ou outra região metropolitana, enquanto que outras foram possivelmente transmitidas entre ambas as regiões.

A existência de alguns grupos de linhagens de *Shigella*, de ambas as espécies, com muitas variações genotípicas nas duas áreas estudadas, poderia ser explicada tanto pela introdução de novos genótipos, considerando a migração populacional entre e para estas duas cidades, quanto por uma alta taxa de variabilidade genética. A prevalência de genótipos específicos em cada área geográfica sugere que alguns genótipos tiveram sucesso às condições locais.

Através das técnicas de ERIC-PCR e REP-PCR e PFGE não foi possível identificar um único clone responsável pela ocorrência de casos de shigelose nas regiões das cidades de Campinas e Ribeirão Preto neste período, ou seja, não foi possível determinar uma fonte comum para os casos, indicando, ou variabilidade genotípica pré-existente nas linhagens, ou frequência de mutação rápida.

Apesar dos resultados observados neste trabalho, devemos considerar a possibilidade de existirem nestas cidades outros genótipos que não tenham sido aqui analisados. A shiguelose não é uma doença de notificação compulsória e pode não ser corretamente diagnosticada, fazendo com que um número de casos abaixo do real, possa ter sido detectado e analisado. Além disso, as amostras aqui estudadas incluem apenas as isoladas no serviço público de saúde, não incluindo as isoladas em outros serviços, que não o público. O uso de técnicas de estoque das linhagens que conservem as características genéticas originais e de métodos mais sensíveis para diagnóstico, como os de identificação molecular, além dos tradicionais de rotina, faria com que os números de ocorrência das shigueloses se aproximassem do real (Ram *et al.*, 2008).

Em relação ao perfil de integrons observado para as linhagens de *S. sonnei* não foi possível determinar uma correlação entre a presença dos integrons, o perfil de resistência a antimicrobianos e os resultados obtidos pelos métodos de epidemiologia molecular.

Embora a presença de integrons esteja, normalmente, associada à existência de resistências simples, ou múltiplas, a antimicrobianos e a perda ou ganho de integrons possa influenciar no perfil de resistência, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de um ou mais integrons e o fenótipo de resistência antimicrobiana, pois mesmo linhagens filogeneticamente distantes no dendrograma possuem perfis de resistência semelhantes e linhagens próximas podem, ou não, apresentar o mesmo perfil de integrons.

Muitos trabalhos têm relacionado a presença de integrons com a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Ploy *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2003; Parsot, 2005), mas os resultados obtidos no presente trabalho não permitem estabelecer esta relação como regra.

O integron de classe 2 foi encontrado em todas as linhagens testadas, enquanto que o integron 1 não foi detectado duas delas (CS7 e CS16C) (tabela 13). Nossos resultados concordam com os descritos por Dubois *et al.* (2007) os quais verificaram que o integron de classe 2 é o mais freqüentemente encontrado em *S. sonnei* que o integron de classe 1.

Todas as linhagens de *S. sonnei* da região de Campinas, isoladas a partir de 2001, com exceção de CS10 e CS12, apresentaram resistência apenas aos antimicrobianos sulfametoxazol (SUT) e tetraciclina (TT), ou seja, o fenótipo predominantemente encontrado nesta região a partir de 2001 não apresentou resistência aos antimicrobianos estreptomicina e ampicilina (tabela 13).

A resistência a antimicrobianos tem sido observada entre *Shigella spp.* desde os anos 40, quando foram descritas, pela primeira vez, linhagens resistentes à sulfonamida (Lima *et al.*, 1995). Segundo Lima *et al.* (1995), até 1991 ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazol eram as drogas de escolha para o tratamento de pacientes com shigelose. De 1989 a 1991 mais de 50% dos isolados apresentaram resistência ou à ampicilina ou ao trimetoprim-sulfametoxazol ou a ambas as drogas. Em 1991, de acordo com uma orientação de órgãos responsáveis pela saúde no estado do Ceará (Universidade Federal do Ceará e Secretaria de Saúde do Estado), o ácido nalidíxico passou a ser a droga de escolha no tratamento de suspeitas de shigeloses e, neste mesmo ano, foi observado um aumento de 10% de linhagens resistentes a este antimicrobiano.

Informações como as compiladas em trabalhos como este podem auxiliar a direcionar a priorização dos preciosos recursos disponibilizados para os programas de saúde pública. Análises moleculares agregam informações a respeito da endemicidade das *Shigella* isoladas, por identificar as múltiplas populações circulantes e fornecer informações a respeito da ocorrência, transmissão de resistência e distribuição temporal e geográfica dos

clones, e desta forma colaborar com desenvolvimento de estratégias de intervenção e prevenção. Além disto, é interessante que sejam desenvolvidos estudos posteriores a respeito da shigelose nas duas áreas aqui consideradas, acompanhando os casos de shigelose ocorridos em anos subseqüentes para que se possa melhor avaliar: a possível transmissão de genótipos entre estas duas áreas em um intervalo maior de tempo; o perfil de resistência a antimicrobianos característico de cada região e sua relação com o perfil de integrons detectado; a sazonalidade e faixa etária dos isolamentos, juntamente com os fatores que as determinam.

6. Conclusões

1. Dos 119 casos de shigeloses estudados neste trabalho, 57,9% dos causados por *S. sonnei* e 64,4% dos causados por *S. flexneri* afetaram crianças com menos de 5 anos de idade.
2. A maior parte das infecções ocorreu durante o verão, a estação de maior precipitação de chuva, mas apesar disso, também foi observado um grande número de infecções durante as outras estações do ano
3. Os resultados obtidos pelas técnicas de ERIC-PCR, REP-PCR e PFGE não identificaram um único clone responsável pelos casos de shigelose nas regiões de Campinas e Ribeirão Preto, o que indica que estes casos não sejam provenientes de uma fonte comum.
4. A análise de ERIC-PCR e REP-PCR identificou alguns grupos de identidade entre as linhagens isoladas em ambas as regiões, ou seja, grupos de linhagens com grande similaridade genética, responsáveis pelos casos de shigelose. Estes resultados sugerem que esteja havendo transmissão de linhagens entre as cidades de uma mesma região, mas não demonstraram a transmissão entre as regiões de Campinas e Ribeirão Preto.
5. Os resultados obtidos por PFGE identificaram alguns grupos genotípicos, com alto grau de variações genéticas, circulantes nas regiões estudadas, durante o período analisado. Estes grupos demonstraram, algumas vezes, estarem restritos a apenas uma região, ou, como ocorreu com a maior parte dos genótipos, terem circulado em ambas as regiões.

6. A presença de integrons não pôde ser correlacionada com os diferentes perfis de resistência e os resultados obtidos pelos métodos de epidemiologia molecular.

Referências bibliográficas

Alekshun, M. N.; Levy, S. B. 2007. Molecular mechanism of antimicrobial multidrug resistance. *Cell*, 128 (6):1037-1050.

Apella, M. C.; Gonzalez, S. N.; Nader de Macias, M. E.; Romero, N.; Oliver, G. 1992. In vitro studies on the inhibition of growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 480-483.

Araújo, E. D.; Carbonare, S. B.; Araújo, M. C.; Palmeira, P.; Amaral, J. A.; Sales, V. S. 2005. Total and specific IgA in colostrum and milk of mothers of Natal-Rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Cir. Bras.* 20 (1): 178-184.

Ashkenazi, S.; Dinari, G.; Zevulunov, A.; Nitzan, M.; 1987. Convulsions in childhood shigellosis. Clinical and laboratory features in 153 children. *Am. J. Dis. Child.* 141: 208-210.

Ashkenazi, S.; Cleary, K. R.; Pickering, L. K.; Murray, B. E.; Cleary, T. G. 1990. The association of Shiga toxin and other cytotoxins with the neurologic manifestations of shigellosis. *J. Infect. Dis.* 161: 961-965.

Ashkenazi, S.; Levy, I.; Kazaronovski, V.; Samra, Z. 2003. Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 427-429.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J. A.; Seidman, J. G.; Struhl, K. 1988. *Curr. Prot. Mol. Biol.* Green Publishing Associates, Brooklyn, N. Y.

Barbier, N., P.; Saulnier, E.; Chachaty, S.; Dumontier, S.; Andremon, A. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol. 34: 106–109.

Bennish, M. L. 1991. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev. Infect. Dis. 13 (4): 319-324.

Bernardini, M. L.; Mounier, J.; d’Hauteville, H.; Coquis-Rondon, M.; Sansonetti, P. J. 1989. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 86 (10): 3867-3871.

Bertin, J.; Nir, W. J.; Fischer, C. M.; Tayber, O. V.; Errada, P. R.; Grant, J. R.; Keilty, J. J.; Gosselin, M. L.; Robison, K. E.; Wong, G. H.; Glucksmann, M. A.; DiStefano, P. S. 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B. J. Biol. Chem. 274: 12955-12958.

Black, R. E.; Craun, G. F.; Blake, P. A. 1978. Epidemiology of common-source outbreaks of shigellosis in the United States, 1961-1975. Am. J. Epidemiol. 108: 47-52.

Black, R. E.; Brown, K. H.; Becker, S.; Alim, A. R.; Huq, I. 1982. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II. Incidence of diarrhea and association with known pathogen. Am. J. Epidemiol. 115: 315-324.

- Blaser, M. J.; Hale, T. L.; Formal, S. B. 1989. Recurrent shigellosis complicating human immunodeficiency virus infection: failure of pre-existing antibodies to confer protection. *Am. J. Med.* 86: 105-107.
- Blocker, A.; Gounon, P.; Larquet, E.; Niebuhr, K.; Cabiaux, V.; Parsot, C.; Sansonetti, P. 1999. The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell. Biol.* 147: 683-693.
- Bourdet-Sicard, R.; Rüdiger, M.; Jockusch, B. M.; Gounon, P.; Sansonetti, P. J.; Tran Van Nhieu, G. 1999. Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J.* 18: 5853-5862.
- Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
- Burton, E. A.; Plattner, R.; Pendergast, A. M. 2003. Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *EMBO J.*, 22 (20): 5471-5479.
- Burton, E. A.; Pendergast, A. M.; Aballay, A. 2006. The *Caenorhabditis elegans* ABL-1 tyrosine kinase is required for *Shigella flexneri* pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7): 5043-51.
- Butler, T.; Speelman, P.; Kabir, I.; Banwell, J. 1986. Colonic dysfunction during shigellosis. *J. Infect. Dis.* 154: 817-824.

- Buyse, J. M.; Stover, C. K.; Oaks, E. V.; Venkatesan, M.; Kopecko, D. J. 1987. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. J. Bacteriol. 169(6):2561-2569.
- Chen, Y.; Smith, M. R.; Thirumalai, K.; Zychlinsky, A. 1996. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. EMBO J. 15: 3853-3860.
- Chiou, C. S.; Wci, H. L.; Wang, Y. W.; Liao, J. C.; Li, C. C. 2006. Usefulness of inter-IS1 spacer polymorphisms for subtyping of *Shigella sonnei* isolates. J Clin. Microbiol. 44(11): 3928-3933.
- Clerc, P.; Sansonetti, P. J. 1987. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerisation and myosin accumulation. Infect. Immun. 55: 2681-2688.
- Cossart, P.; Sansonetti, P.; J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science. 304: 242-248.
- DeLappe, N.; O'Halloran, F.; Fanning, S.; Corbett-Feeney, G.; Cheasty, T.; Cormican, M. 2003. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection. J. Clin. Microbiol. 41(5): 1919-1924.
- Diniz-Santos, D. R.; Santana, J. S.; Barretto, J. R.; Andrade, M. G. M.; Silva, L. R. 2005. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 9: 77-83
- Dorman, C. J. 1995. DNA topology and global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. Microbiol. 141: 1271-1280.

- Dubois, V.; Parizano, M. P.; Arpin, C.; Coulange, L.; Bezian, M. C.; Quentin, C. 2007. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51(4): 1333-1340.
- DuPont, H. L.; Hornick, R. B.; Dawkins, A. T.; Snyder, M. J.; Formal, S. B. 1969. The response of man to virulent *Shigella flexneri* 2a. *J. Infect. Dis.* 119: 296-299.
- DuPont, H. L.; Levine, M. M.; Hornick, R. B.; Formal, S. B. 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* 159(6):1126-1128.
- Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Falcão, J. P.; Falcão, D. P.; Pitondo-Silva, A.; Malaspina, A. C.; Brocchi, M. 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 55: 1539- 1548.
- Fernandez, M. I.; Thuizat, A.; Pedron, T.; Neutra, M.; Phalipon, A.; and Sansonetti, P. J. 2003. A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis. *Cell Microbiol.* 5: 481–491.
- Ferreccio, C.; Prado, V.; Ojeda, A.; Cayyazo, M.; Abrego, P.; Guers, L.; Levine, M. M. 1991. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 134 (6): 614- 627.

- Ferreira, A. M. T.; Suzart, S.; Vidotto, O.; Knowles, D. P.; Vidotto, M. C. 2001. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. FEMS Microbiol. Letters. 197: 139-143.
- Finch, M.; Rodey, G.; Lawrence, D.; Blake, P. 1986. Epidemic reiters syndrome following an outbreak of shigellosis. Eur. J. Epidemiol. 2: 26-30.
- Gilson, E.; Perrin, D.; Hofnung, M. 1990. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. Nucleic Acids Res. 18: 3941–3952.
- Girardin, S. E.; Tournebize, R.; Mavris, M.; Page, A. L.; Li, X.; Stark, G. R.; Bertin, J.; DiStefano, P. S.; Yanivi, M.; Sansonetti, P. J.; Philpott, D. J. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. EMBO J. 20 (8): 736-742.
- Gouin, E.; Welch, M. D.; Cossart, P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. Curr. Opin. Microbiol. 8: 35-45.
- Grundmann, H.; Schneider, C.; Hartung, D.; Daschner, F. D.; and Pitt, T. L. 1995. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 33: 528–534.
- Hale, T. L. 1991. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. Microbiol. Rev. 55 (2): 206-224.
- Hall, R. M.; Collis, C. M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol. 15 (4): 593-600.

Haraga, A.; Miller, S. I. 2003. A *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect. Immun.* 71: 4052-4058.

Harrington, S. M.; Stock, F.; Kominski, A.; L.; Campbell, J. D.; Hormazabal, J. C.; Livio, S.; Rao, L.; Kotloff, K. L.; Sow, S. O.; Murray, P. R. 2007. Genotypic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa, by semiautomated repetitive-element PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 45 (3): 707-714.

High, N.; Mounier, J.; PreÂvost, M. C.; Sansonetti, P. J. 1992. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* 11 (5): 1991-1999.

Hulton, C. S. J.; Higgins, C. F.; Sharp, P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5:825-834.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE - Cidades@. Disponível em URL: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>. Acessado em 13 de junho de 2009.

Inohara, N.; Koseki, T.; del Peso, L.; Hu, Y.; Yee, C.; Chen, S.; Carrio, R.; Merino, J.; Liu, D.; Ni, J.; Núñez, G. 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 274: 14560-14567.

Jennison, A. V.; Verma, N. K. 2004. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 43-58.

- Jones, F. R.; Sanchez, J. L.; Meza, R.; Batsel, T. M.; Burga, R.; Canal, E.; Block, K.; Perez, J.; Bautista, C. T.; Escobedo, J.; Walz, S. E. 2004. High incidence of shigellosis among peruvian soldiers deployed in the amazon river basin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(6): 663–665.
- Keusch, G. T. 1998. The rediscovery of Shiga toxin and its role in clinical disease. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 51: S5-S22.
- Kim, Y. E.; Kwon, H. J.; Cho, S. H.; Kim, S.; Lee, B. K.; Yoo, H. S.; Park, Y. H.; Kim, S. J. 2006. Molecular differentiation of common promoters in *Salmonella* class 1 integrons. *J. Microbiol. Methods.* 68(3): 453-475.
- Kirkegaard, K.; Taylor, M. P.; Jackson, W. T. 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 301-314.
- Kosek, M.; Yori, P. P.; Pan, W. K.; Olortegui, M. P.; Gilman, R. H.; Perez, J.; Chavez, C. B.; Sanchez, G. M.; Burga, R.; Hall, E. 2008. Epidemiology of highly endemic multiply antibiotic-resistant shigellosis in children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics.* 122(3): 541–549.
- Kotloff, K. L.; Winickoff, J. P.; Ivanoff, B.; Clemens, J. D.; Swerdlow, D. L.; Sansonetti, P. J.; Adak, G. K.; Levine, M. M. 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.* 77: 651–666.

- Kueltzo, L. A.; Osiecki, J.; Barker, J.; Picking, W. L.; Ersoy, B.; Picking, W. D.; Middaugh, C. R. 2003. Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. J. Biol. Chem. 278: 2792-2798.
- Lafont, F.; Tran Van Nhieu, G.; Hanada, K.; Sansonetti, P.; van der Goot, F. G. 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. EMBO J. 21: 4449-4457.
- Lan, R.; Reeves, P. R. 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. Microbes. Infect. 4: 1125-1132.
- Lett, M. C.; Sasakawa, C.; Okada, N.; Sakai, T.; Makino, S.; Yamada, M.; Komatsu, K.; Yoshikawa, M. 1989. virG, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence. J. Bacteriol. 171: 353-359.
- Levine, M. M.; DuPont, H. L.; Formal, S. B.; Hornick, R. B.; Takeuchi, A.; Gangarosa, E. J.; Snyder, M. J.; Libonati, J. P. 1973. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. J Infect Dis. 127: 261-270.
- Lima, A. A. M.; Lima, N. L.; Pinho, M. C. N.; Barros Junior, E. A.; Teixeira, M. J.; Martins, M. C. V.; Guerrant, R. L. 1995. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 256-259.

Lima, A. A. M.; Sidrim, J. J. C.; Lima, N. L.; Titlow, W.; Evans, M. E.; Greenberg, R. N. 1997. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. J Clin Microbiol. 35 (5): 1061-1065.

Liu, P. Y. F.; Lau, Y. J.; Hu, B. S.; Shyr, J. M.; Shi, Z. Y.; Tsai, W. S.; Lin, Y. H.; Tseng, C. Y. 1995. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J Clin Microbiol. 33(7): 1779-1783.

Maguire, A. J.; Brown, D. F. J.; Gray, J. J.; Desselberger, U. 2001. Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. Antimicrob. Agents. Chemother. 45 (4): 1022-1029.

Maranhão, H. S.; Medeiros, M. C. C.; Scaletsky, I. C. A.; Neto, U. F.; Morais, M. B. 2008. The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with acute diarrhoea, in north-eastern Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol. 102(4): 357-365.

Mathan, V. I.; Mathan, M. M. 1991. Intestinal manifestations of invasive diarrhoeas and their diagnosis. Rev. Infect. Dis. 13 (4): 311-313.

Maurelli, A. T.; Blackmon, B.; Curtiss, R. 3rd. 1984. Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. Infect. Immun., 43:195-201.

Maurelli, A. T.; Baudry, B.; D'Hauteville, H.; Hale, T. L.; Sansonetti, P. J. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. Infect. Immun., 49: 164-171.

Meânard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. 1993. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. J. Bacteriol. 175: 5899-5906.

Meânard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. 1994a. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is induced by the epithelial cell and controlled by IpaB and IpaD. EMBO J. 13: 5293-5302.

Meânard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C.; Vasselon, T. 1994b. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. Cell. 79: 515-525.

Medeiros, M. I. C.; Neme, S. M.; Silva, P.; Capuano, D. M.; Errera, M. C.; Fernandes, S. A.; Valle, G. R.; Ávila, F. A. 2001. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo. 43: 21-24.

Ménard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. 1993. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. J. Bacteriol. 175 (18): 5899-906

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor Lab. Press.

Moreno, A. C. R.; Filho, A. F.; Gomes, T. A. T.; Ramos, S. T. S.; Montemor, L. P. G.; Tavares, V. C.; Filho, L. S.; Irinoe, K.; Martinez, M. B. 2008. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 26 (Epub ahead of print).

Moss, J. E.; Cardozo, T. J.; Zychlinsky, A.; Groisman, E. A. 1999. The SelC-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 33: 74-83.

- Mounier, J.; Vasselon, T.; Hellio, R.; Lesourd, M.; Sansonetti, P. J. 1992. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. Infect. Immun. 60: 237-248.
- Murray, B. E.; Singh, K. V.; Heath, J. D.; Sharma, B. R.; and Weinstock, G. M. 1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcus isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J. Clin. Microbiol. 28: 2059–2063
- Nataro, J. P. 2004. Vaccines against diarrheal diseases. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 15: 272–279.
- Navare, W. W.; Zychlinsky, A. 2000. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. Cell Microbiol. 2: 265-273.
- Navia, M. M.; Capitano, L.; Ruiz, J.; Vargas, M.; Urassa, H.; Schellemborg, D.; Gascon, J.; Vila, J. 1999. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella spp.* isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. J. Clin. Microbiol. 37 (10): 3113-3117.
- Newbury, S. F.; Smith, N. H.; Robinson, E. C.; Hiles, I. D.; Higgins, C. F. 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. Cell. 48: 297–310.
- Niebuhr, K.; Giuriato, S.; Pedron, T.; Philpott, D. J.; Gaits, F.; Sable, J.; Sheetz, M. P.; Parsot, C.; Sansonetti, P. J.; Payrastra, B. 2002. Conversion of PtdIns(4,5)P₂ into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. EMBO J. 21(19): 5069-5078.

- Niyogi, S. K. 2005. Shigellosis. *J. Microbiol.* 23(2): 133-143.
- Ochman, H.; Whittam, T. S.; Causant, D. A.; Selander, R. K. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2715-2726.
- Ogawa, M.; Yoshimori, T.; Suzuki, T.; Sagara, H.; Mizushima, N.; Sasakawa, C. 2005. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*. 307: 727-731.
- Ogawa, M.; Sasakawa, C. 2006. Intracellular survival of *Shigella*. *Cell. Microbiol.*, 8 (2): 177-184.
- Oh, J. Y.; Yu, H. S.; Kim, S. K.; Seol, S. Y.; Cho, D.; Lee, J. C. 2003. Changes in Patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from south-western Korea during epidemic periods. *J. Clin. Microbiol.* 41(1): 421-423.
- Ohya, K.; Handa, Y.; Ogawa, M.; Suzuki, M.; Sasakawa, C. 2005. IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J. Biol. Chem.* 280: 24022-24034.
- Okeke, I. N.; Edelman, R. 2001. Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clin. Infect. Dis.* 33(3): 364-369.
- Okuda, J.; Toyotome, T.; Kataoka, N.; Ohno, M.; Abe, H.; Shimura, Y.; Seyedarabi, A.; Pickersgill, R.; Sasakawa, C. 2005. *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2): 531-539.

Olive, D. M.; Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. 37: 1661-1669.

Parsot, C. 2005. *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. FEMS Microbiol. Lett. 252 (1):11-18.

Patersen, A.; Guardabassi, L.; Dalsgaard, A.; Olsen, J. 2000. Class 1 Integrons containing a dhfrI trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter spp.* FEMS Microbiol. Lett. 182 (1): 73-76.

Peirano, G.; Agerso, Y.; Aarestrup, F. M.; Rodrigues, D. D. P. 2005. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide resistant *Shigella spp.* from Brazil. J. Antimicrob Chemother. 55 (3): 301-05.

Peirano, G.; Souza, F. S.; Rodrigues, D. P. 2006. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella spp.* from Brazil. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 101 (3): 245-250.

Penatti, M. P. A.; Hollanda, L. M.; Nakazato, G.; Campos, T. A.; Lancellotti, M.; Angelini, M.; Brocchi, M.; Rocha, M. M.; Dias da Silveira, W. 2007. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in southeast Brazil. Braz. J. Med. Biol. Res. 40: 249-258.

Pendergast, A. M. 2002. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. Adv. Cancer Res. 85: 51-100.

- Philpot, D. J.; Yamaoka, S.; Israel, A.; Sansonetti, P. J. 2000. Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.* 165: 903-914.
- Ploy, M. C.; Denis, F.; Courvalin, P.; Lambert, T. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44 (10): 2684-2688.
- Prevost, G.; Jaulhac, B.; Piedmont, Y. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30: 967-973.
- Pupo, G. M.; Karaolis, D. K.; Lan, R.; Reeves, P. R. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* 65: 2685-2692.
- Pupo, G. M.; Lan, R.; Reeves, P. R. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10567-10572.
- Rajakumar, K.; Sasakawa, C.; Adler, B. 1997. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun.* 65: 4606-4614.
- Ram, P. K.; Crump, J. A.; Gupta, S. K.; Miller, M. A.; Mintz, E. D. 2008. Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect.* 136: 577-603.

- Ranjbar, R.; Aleo, A.; Giammanco, G. M.; Dionisi, A. M.; Sadeghifard, N.; Mammina, C. 2007. Genetic relatedness among isolates of *Shigella sonnei* carrying class 2 integrons in Teheran, Iran, 2002-2003. BMC Infect. Dis. 7 (62): 1-7.
- Raqib, R.; Lindberg, A. A.; Wretling, B.; Bardhan, P. K.; Anderson, U.; Anderson, J. 1995. Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. Infect. Immun. 63: 289-296.
- Régua-Mangia, A. H.; Gomes, T. A. T.; Andrade, J. R. C.; Vieira, M. A. M.; Gonzalez, A. G. M.; Zahner, V.; Irinos, K.; Teixeira, L. M. 2003. Genetic Analysis of *Escherichia coli* strains carrying enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) markers, isolated from children in Rio de Janeiro city, Brazil. Braz. J. Microbiol. 34: 38-41.
- Rodriguez, I.; Rodicio, M. R.; Herrera-Leon, S.; Echeita, A.; Mendoza, M. C. 2008. Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. Int. J. of Antimicrob. Agents. 32 (2):158-164.
- Ross, T. L.; Merz, W. G.; Farkosh, M.; Carroll, K. C. 2005. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 43 (11): 5642-5647.
- Sack, D. A.; Lyke, C.; McLaughlin, C.; Suwanvanichkij, V. (2001). Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. World Health Organization/CDS/CSR/DRS/2001.8.

- Sakai, T.; Sasakawa, C.; Makino, S.; Yoshikawa, M. 1986. DNA sequence and product analysis of the virF locus responsible for congo red binding and cell division in *Shigella flexneri* 2a. Infect. Immun. 54 (2): 395-402.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sansonetti, P. J.; Kopecko, D. J.; Formal, S. B. 1981. *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. Infect. Immun.. 34: 75-83.
- Sansonetti, P. J.; Kopecko, D. J.; Formal, S. B. 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infect. Immun. 35: 852-860.
- Sansonetti, P. J.; d'Hauteville, H.; Ecobichon, C.; Pourcel, C. 1983a. Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Ann. Microbiol (Paris). 134A(3):295-318.
- Sansonetti, P. J.; Hale, T. L.; Dammin, G. J.; Kapfer, C.; Collins Jr, H. H.; Formal, S. B. 1983b. Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. Infect Immun. 39: 1392-1402.
- Sansonetti, P. J. 1999. *Shigella* plays dangerous games. ASM News. 65, 611-617.
- Sasakawa, C.; Kamata, K.; Sakai, T.; Makino, S.; Yamada, M.; Okada, N.; Yoshikawa, M. 1988. Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 170: 2480- 2484.

- Sasakawa, C.; Adler, B.; Tobe, T.; Okada, N.; Nagai, S.; Komatsu, K.; Yoshikawa, M. 1989. Functional organization and nucleotide sequence of virulence region-2 on the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* 2a. *Mol. Microbiol.* 3: 1191-1201.
- Schmitz, F. J.; Hafner, D.; Geisel, R.; Follmann, P.; Kirschke, C.; Verhoef, J.; Kohrer, K.; Fluit, A. D. C. 2001. Increased prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species and *Enterobacter* species isolates over a 7 year period in German University Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 39(10): 3724-3726.
- Schroeder, G. N.; Hilbi, H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(1): 134-156.
- Schwartz, D. C.; Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67–75.
- Shamebo, D.; Sandström, A.; Muhe, L.; Freij, L.; Krantz, I.; Lönnbeerg, G.; Wall, S. 1993. The Butajira project in Ethiopia: a nested case-referent study of under-five mortality and its public health determinants. *Bull. World. Health Organ.* 71: 389-396.
- Sharples, G. J.; Lloyd, R. G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18: 6503–6508.
- Shears, P. 1996. *Shigella* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90 (2): 105-144.
- Sheikh, H.; Isacke, C. M. 1996. A di-hydrophobic Leu-Val motif regulates the basolateral localization of CD44 in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 12185-12190.

Sieper, J.; Braun, J.; Wu, P.; Hauer, R.; Laitko, S. 1993. The possible role of *Shigella* in sporadic enteric reactive arthritis. Br. J. Rheumatol. 32: 582-585.

Silveira, W. D.; Ferreira, A.; Lancellotti, M.; Barbosa, I. A. G. C. D.; Leite, D. S.; Castro, A. F. P.; Brocchi, M. 2002. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. Vet. Microbiol. 89: 323-328.

Singer, M.; Sansonetti, P. J. 2004. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of *Shigella*-induced colitis. J. Immunol. 173: 4197–4206.

Sinha, A. K.; Bhattacharya, S. K.; Sem, D.; Sengupta, P. G.; Pal, S. C. 1987. Leukemoid reaction in *Shigella dysenteriae* type 1 infection. Indian J. Med. Res. 85: 500-502.

Skoudy, A.; Mounier, J.; Aruffo, A.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Sansonetti, P.; Tran Van Nhieu, G. 2000. CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell. Microbiol. 2 (1): 19-33

Small, P.; Blankenhorn, D.; Welty, D.; Zinser, E.; Slonczewski, J. L. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth ph. J. Bacteriol. 176 (6): 1729-1737.

Sobel, J.; Gomes, T. A.; Ramos, R. T.; Hoekstra, M.; Rodrigue, D.; Rassi, V.; Griffin, P. M. 2004. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in São Paulo, Brazil. Clin. Infect. Dis. 38 (11): 1545-51.

Straden, A.; Frei, R.; Widmer, A. F. 2003. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? J. Clin. Microbiol. 41: 3181-3186.

Struelens, M. J.; Patte, D.; Kabir, I.; Salam, A.; Nath, S. K.; Butler, T. 1985. *Shigella* septicemia: prevalence, presentation, risk factors and outcome. J. Infect. Dis. 152: 784-790.

Sur, D.; Ramamurthy, T.; Deen, J.; Bhattacharya, S. K. 2004. Shigellosis: challenges & management issues. Indian J. Med. Res. 120 (5): 454-462.

Surdeanu, M.; Ciudin, L.; Pencu, E.; Straut, M. 2003. Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. Eur. J. Epidemiol. 18: 703-710.

Suzuki, T.; Nakanishi, K.; Tsutsui, H.; Iwai, H.; Akira, S.; Inohara, N.; Chamaillard, M.; Nun, G.; Sasakawa, C. 2005. A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. J. Biol. Chem. 280 (14): 14042–14050.

Taylor, D.; Echeverria, P.; Pal, T.; Sethabutr, O.; Saiborisuth, S.; Sricharmorn, S.; Rowe, B.; Cross, J. 1986. The role of *Shigella spp.*, enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as cause of childhood dysentery in Thailand. J. Infect Dis. 153: 1132-1138.

Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; He'bert, G. A.; Hill, B.; Hollis, R.; Jarvis, W. R.; Kreiswirth, B.; Eisner, W.; Maslow, J.;

McDougal, L. K.; Miller, J. M.; Mulligan, M.; Pfaller, M. A. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32:407–415.

Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.

Tran Van Nhieu, G.; Ben-Ze'ev, A.; Sansonetti, P. J. 1997. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. EMBO J. 16: 2717-2729.

Tran Van Nhieu, G.; Caron, E.; Hall, A.; Sansonetti, P.J. 1999. IpaC determines actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. EMBO J. 18: 3249-3262.

Tran Van Nhieu, G.; Bourdet-Sicard, R.; Duménil, G.; Blocker, A.; Sansonetti, P. J. 2000. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. Cell. Microbiol. 2 (3): 187-93

Turner, S. A.; Luck, S. N.; Sakellaris, H.; Rajakumar, K.; Adler, B. 2001. Nested deletions of the SRL pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a. J. Bacteriol. 183: 5535-5543.

Uchiya, K.; Tobe, T.; Komatsu, K.; Suzuki, T.; Watarai, M.; Fukuda, I.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. 1995. Identification of a novel virulence gene, VirA, on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading. Mol. Microbiol. 17: 241-250.

Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.

Walker, J. C.; Verma, N. K. 2002. Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridization of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 10580: 1-8.

Watarai, M.; Tobe, M.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. 1995. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasions and is an essential function of invasiveness. *EMBO J.* 14: 2461-2470.

Watarai, M.; Funato, S.; Sasakawa, C. 1996. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha 5 \beta 1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J. Exp. Med.* 183: 991-999.

Wei, J.; Goldberg, M. B.; Burland, V.; Venkatesan, M. M.; Deng, W.; Fournier, G.; Mayhew, G. F.; Plunkett, G. 3rd.; Rose, D. J.; Darling, A.; Mau, B.; Perna, N. T.; Payne, S. M.; Runyen-Janecky, L. J.; Zhou, S.; Schwartz, D. C.; Blattner, F. R. 2003. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect. Immun.* 71 (5): 2775-2786.

Wei, H. L.; Wang, Y. W.; Li, C. C.; Tung, S. K.; Chiou, C. S. 2007. Epidemiology and evolution of genotype and antimicrobial resistance of an imported *Shigella sonnei* clone circulating in central Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58 (4): 469-475.

Werner, E.; Holder, A. A.; Hoheisel, J. D. 1997. Growth and storage YAC clones in Hogness Freezing Medium. *Nucleic Acids Res.* 25 (7): 1467-1468.

Wharton, M.; Spiegel, R. A.; Horan, J. M.; Tauxe, R. V.; Wells, J. G.; Barg, N.; Herndon, J.; Meriwether, R. A.; MacCormack, J. N.; Levine, R. H. 1990. A large outbreak of antibiotic-resistant shigellosis at a mass gathering. *J. Infect. Dis.* 162: 1324-1328.

Wilson, L. A.; Sharp, P. M. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol. Biol. Evol.* 23 (6): 1156-1168.

World Health Organization. WHO/CDR/95.4. World Health Organization. Guidelines for the control of epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1, Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control. 1994.

World Health Organization. State of the art of new vaccines. Research and development: initiative for vaccine research. Geneva, 8-9, 2003.

World Health Organization. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. Geneva, Switzerland, 2005.

Yang, Y.; Ames, G. F. L. 1988. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8850–8854.

Yatsuyanagi, J.; Saito, S.; Sato, H.; Miyajima, Y.; Amano, K.; Enomoto, K. 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 40 (1): 294-297.

- Yoshida, S.; Katayama, E.; Kuwae, A.; Mimuro, H.; Suzuki, T.; Sasakawa, C. 2002. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J. 21 (12): 2923-2935.
- Zhang, W.; Pan, J. C.; Meng, D. M.; Ye, R.; Wang, H. Q. 2007. PFGE of *Shigella flexneri* 4c isolates from food-poisoning outbreaks and sporadic diarrhea patients. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 41: 50-53.