



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DO PERFIL DE
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE SHIGELLA ASSOCIADAS À
DIARRÉIA INFANTIL, ISOLADAS EM MANAUS-AM NO PERÍODO ENTRE 2007
A 2009

Maria Carolina Scheffer de Souza

Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi
Co-Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

Manaus-AM

2012

CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE SHIGELLA ASSOCIADAS À DIARRÉIA INFANTIL, ISOLADAS EM MANAUS-AM NO PERÍODO ENTRE 2007 A 2009

MARIA CAROLINA SCHEFFER DE SOUZA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada, área de concentração: Biologia de Agentes Patogênicos.

Dissertação julgada e aprovada, em sua forma final, pelos orientadores e membros da comissão examinadora:

Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Dra. Aya Sadahiro

Dr. Paulo Afonso Nogueira

Dra. Najla Benevides Matos

Manaus, 12 de novembro de 2012.

RESUMO

A shigelose é uma doença manifestada desde uma diarreia leve até uma severa disenteria. A habilidade de invadir células e provocar lesão na mucosa intestinal, bem como levar ao desequilíbrio na homeostase e modular a resposta inflamatória em nível intestinal tem sido atribuídos a diversos fatores de patogenicidade das *Shigella* spp. Neste trabalho, trinta e seis isolados de *Shigella* foram identificados a partir de um estudo etiológico de diarreia infantil em 1.500 crianças com idade entre zero a dez anos que deram entrada nos hospitais de Manaus (Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste) com quadro diarreico, no período entre agosto de 2007 a julho de 2009. *Shigella flexneri* foi à espécie mais frequente (65%), seguida por *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12,5%) e *S. dysenteriae* (2,5%). Entre os isolados, merece destaque o aparecimento de um isolado resistente (intermediária) à ciprofloxacina e 1 resistente (intermediária) à ceftriaxona, que são os antibióticos recomendados pela OMS. A tipagem molecular dos fatores de patogenicidade mostrou evidências sobre o potencial patogênico da subunidade *shet-1B* das *Shigellas*, podendo levar a complicações relacionadas à desidratação, de *IpaH* na febre e na lesão do intestino evidenciado pelo diarreia sanguinolenta. *IpaBCD* foram os fatores de virulência mais predominantes seguido de *IpaH*. E uma frequência maior de *Shet-2+* em crianças febris em relação a não febris foi verificada. Este estudo vem contribuir com a pouca literatura que existe em relação aos fatores de patogenicidade de isolados de *Shigella* selvagens com quadro diarreico com ou sem shigelose e consolidar a importância de encontrar caminhos para bloquear a toxicidade destes principais fatores de patogenicidade.

PALAVRAS-CHAVE:

Shigella, shigellose, genes de virulência, sintomatologia, patogênese.

ABSTRACT

Shigellosis is a disease manifested from mild diarrhea to severe dysentery. The ability to invade cells, cause injury and imbalance in the homeostasis to the intestinal mucosa and modulate the inflammatory response has been attributed to several factors of pathogenicity of *Shigella spp.* In this study, thirty-six isolates of *Shigella* were identified from an etiologic study of childhood diarrhea in 1,500 children aged 0-10 years who were admitted to hospitals in Manaus (East-South-and-West Zones) between August 2007 and July 2009. *Shigella flexneri* was the most common (65%), followed by *Shigella sonnei* (20%), *Shigella boydii* (12.5%) and *Shigella dysenteriae* (2.5%). Among the isolates, one isolate (intermediate) resistant to ciprofloxacin and 1 (intermediate) to ceftriaxone, which are antibiotics recommended by WHO. Molecular typing of the pathogenicity factors showed evidence of the pathogenic potential of *shet-1B* subunit of *Shigella* and can lead to complications related to dehydration. Frequencies of the *IpaBCD* (the most prevalent factors among isolates) followed by *IpaH* suspect associations to fever and bowel injury. The *IpaH* was clearly associated to bloody diarrhea. And finally, differences in the frequencies of *Shet-2* positives between febrile-based groups reinforce its role in the inflammatory response. This study has contributed to the few data in the literature on the pathogenicity of wild *Shigella* isolates associated to shigellosis and consolidate the importance of finding ways to block the toxicity of these major pathogenicity factors.

KEYWORDS

Shigella, shigellosis, virulence genes, symptomatology, pathogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Células M – *membranous epithelial cells*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – desoxirribonuclease

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

HMDM - macrófagos humanos derivados de monócitos

ICE – enzima convertidora de IL-1 β

IL – interleucina

Ipa - invasion plasmid antigens

LPS – lipopolissacarídeo

MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

Mxi-Spa – locus que codifica o T3SS

Nod – *nucleotide-binding oligomerization domain*

ONPG – orto-nitrofenil- β -galactosídeo

PAI – ilha de patogenicidade

PMN – leucócitos polimorfonucleares

RhoGTPases – família de enzimas hidrolases de papel regulatório

RNA – Ácido ribonucleico

Shet – enterotoxina de *Shigella*

STEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica produtora de toxina de Shiga

Stx – Shiga toxina

T3SS – sistema de secreção do tipo 3

TOF - *Time-Of-Flight*

TUNEL - *Terminaldeoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTPFITC nick end-labeling.*

WHO - World Health Organization

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representação do LPS de <i>Shigella flexneri</i> 5a. Fonte: West et al, 2005.	10
Figura 2 Entrada e disseminação da <i>Shigella</i> nas células epiteliais do intestino.	12
Figura 3 O complexo formado pela proteína <i>IcsA</i> da <i>S. flexneri</i> mais a proteína N-WASP da célula hospedeira, recruta outro, o Arp2/Arp3, que faz a mediação da nucleação para aumentar a cauda de actina. O movimento é facilitado por <i>VirA</i> , que abre caminho através da degradação dos microtúbulos da célula. A <i>Shigella</i> possui ainda a proteína <i>IcsB</i> , que impede o reconhecimento deste complexo e a autofagia.	14
Figura 4 Mapa da ilha de patogenicidade de 30kb do plasmídio.	16
Figura 5 Arquitetura do T3SS Mxi-Spa de <i>S. flexneri</i> . A agulha se destaca do corpo basal para a superfície bacteriana. O contato com a membrana da célula hospedeira promove a inserção das proteínas <i>IpaB-C</i> mediada pela <i>IpaD</i> . Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.	18
Figura 6 Processo de morte do macrófago induzido por <i>Shigella flexneri</i>	21
Figura 7 A) Frequência etária das crianças com diarreia. B) Comparação da faixa etária com a sintomatologia das crianças com diarreia.	34
Figura 8 A) Relação entre o tempo de amamentação das crianças X sintomatologia da diarreia. B) Relação entre a duração da diarreia X sintomatologia.	35
Figura 9 Frequência dos genes de virulência encontrados nas cepas de <i>Shigella</i> isoladas.	36
Figura 10 Relação entre a presença dos genes de virulência e os sintomas A) febre, B) desidratação, C) sangue visível, D) sangue oculto.	39
Figura 11. Relação entre a presença do gene <i>Shet1B</i> e a desidratação das crianças com diarreia,	41
Figura 12. A) Relação entre a idade das crianças com diarreia como fator de pré-disposição à desidratação. B) Avaliação do fator tempo de amamentação como atenuante.	41
Figura 13. Relação entre a presença dos genes <i>Shet1A</i> , <i>Shet1B</i> e <i>Shet2</i> com a desidratação das crianças.	43
Figura 14 Avaliação da presença do gene <i>IpaH</i> em <i>Shigella</i> isoladas de fezes de crianças com diarreia sanguinolenta.	44

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 Genes e primers utilizados no estudo.	32
Tabela 2 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. (In) início da diarreia, (Dur) duração da diarreia, (Ep) número de episódios por ano, (CoPar) contaminação parental, (Am) tempo de amamentação em meses.	68
Tabela 3 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. (AgCon) água para consumo, (Hip) tratamento com hipoclorito, (Ferv) tratamento por fervura, (HigAl) frequência de higiene com alimentos, (PSO) sangue oculto nas fezes.	69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1. <i>Shigella</i> sp.:	9
1.1 Classificação por sorogrupos:	9
2. Shigellose:	10
3. Patogênese celular de <i>Shigella</i> sp.:	12
4. Patogênese molecular de <i>Shigella</i> sp.:	14
5. Mecanismo de indução de morte do macrófago:	19
6. <i>Shigella</i> no Brasil: dados epidemiológicos:	21
7. Prevenção, antibióticos e vacinas:	23
8. Identificação de cepas de <i>Shigella</i> sp.	25
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Caracterização do perfil de resistência a antibióticos	30
Extração de DNA genômico	30
Caracterização do perfil de genes de virulência	31
RESULTADOS	33
Isolamento das cepas de <i>Shigella</i> sp:	33
Relação dos sintomas clínicos com a faixa etária e com os fatores relacionados à atenção à criança: ..	33
Fatores de virulência e sintomatologia:	35
Associação entre Shet1B e desidratação:	40
Associação entre IpaH e sangue oculto:	43
<i>VirF</i> e <i>VirB</i> : análise da função reguladora.	46
Perfil de resistência a antimicrobianos:	48
DISCUSSÃO	49
Caracterização do perfil bioquímico e sorológico:	49
Caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos:	49
Fatores de virulência associados à shigellose pediátrica:	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE I	66
APÊNDICE II	70
APÊNDICE III	71
APÊNDICE IV	74
APÊNDICE V	89

INTRODUÇÃO

1. *Shigella* sp.:

A síndrome diarreica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento. Os patógenos entéricos gram-negativos são os principais agentes etiológicos das diarreias infecciosas, responsáveis por mais de 3 milhões de morte ao ano (CDC 2009).

As bactérias do gênero *Shigella* foram isoladas pela primeira vez em 1896, no Japão, enquanto o Dr. Kyoshi Shiga estudava pacientes com disenteria (Shiga, 1898 *apud* Niyogi, 2005). O organismo foi inicialmente denominado *Bacillus dysenteriae* e posteriormente foi classificado como gênero *Shigella* na edição de 1930 do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Shiga, 1906; Bergey's Manual, 1930; *apud* Trofa et al, 1999). O gênero *Shigella* é atualmente dividido em quatro espécies, classificadas com base nas diferenças bioquímicas e sorológicas: *Shigella dysenteriae*, (*S. dysenteriae*) *Shigella Flexneri* (*S. flexneri*), *Shigella boydii* (*S. boydii*) e *Shigella sonnei* (*S. sonnei*) (Niyogi, 2005; Martinez-Becerra et al, 2012).

Organismos do gênero *Shigella* pertencem à tribo *Escherichia* da família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos pequenos, não encapsuladas, não móveis, não esporulados e anaeróbios facultativos (Schroeder e Hilbi, 2008).

1.1 Classificação por sorogrupos:

A classificação dos sorogrupos é baseada na combinação de um antígeno determinante presente na cadeia polissacarídica O, componente do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da parede celular (Huan et al, 1997; Niyogi, 2005). O LPS de uma bactéria consiste de três regiões: o lipídio A, um núcleo interno e repetidas subunidades do antígeno O (Figura 1). Na *Shigella*, esta subunidade é a tri-ramnose (rha)-*N*-acetil-glicosamina (*N*-ag), um tetrassacarídeo que é modificado pela ação de glicose e/ou acetato, dependendo do sorotipo. A glicosilação altera a

conformação do LPS, tornando a bactéria mais protegida contra a resposta inflamatória do hospedeiro e facilitando a exposição da estrutura que a *Shigella* utiliza para invadir as células: o aparato de secreção do tipo 3 (T3SS). Portanto, a glicosilação do LPS promove a invasão bacteriana e a evasão do sistema imunológico, fato que pode ter contribuído para o surgimento da variedade de sorotipos de *Shigella* (West, Sansonetti et al. 2005).

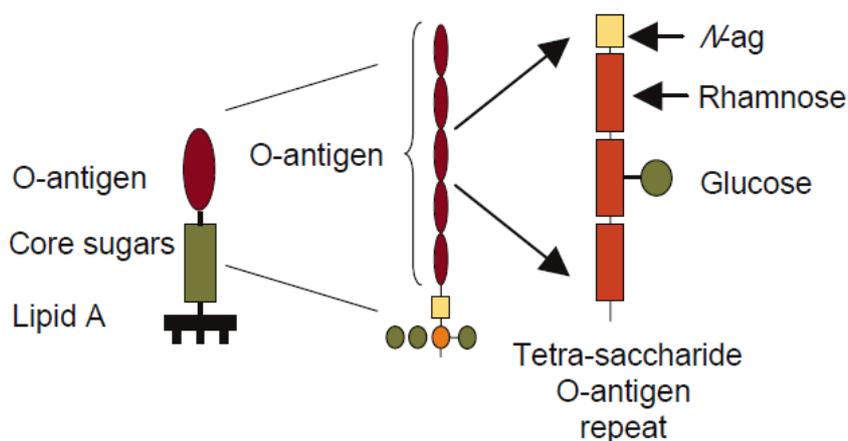


Figura 1 Representação do LPS de *Shigella flexneri* 5a. Fonte: West et al, 2005.

2. Shigellose:

As bactérias do gênero *Shigella* são responsáveis pela shigellose, doença popularmente conhecida por diarreia do viajante ou disenteria bacilar. Esta doença pode manifestar desde uma leve diarreia até uma severa disenteria, que se caracteriza por uma frequente passagem de fezes em pequeno volume, com sangue, muco e leucócitos fecais. (Angelini et al, 2009). Os sintomas que caracterizam a shigellose severa são: febre, náuseas, vômitos e tenesmo retal, podendo aparecer sintomas neurológicos como cefaléia e letargia (Coster et al, 1999). Há relatos de sintomas mais graves, como: hipoglicemia severa e convulsão, (Sansonetti e Egile, 1998). A disseminação da infecção pelo organismo (septicemia) é um evento raro, exceto em crianças mal nutridas (Sansonetti, 2001).

Segundo a OMS (2011), ocorrem 164.7 milhões de casos de shigellose por ano ao redor do mundo, sendo que destes, 163.2 milhões ocorrem em países em desenvolvimento e 1.5 milhão em países industrializados. No geral, 1.1 milhão de casos resultam em morte. Um total de 69% de todos os casos e 61% de todas as mortes envolvem crianças menores de 5 anos. Portanto, é considerada uma doença universal, por ser endêmica no mundo todo.

A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, onde a falta de higiene e acesso limitado à água limpa para beber promove a disseminação de doenças entéricas. A má nutrição e a falta de intervenção médica apropriada contribuem para os altos índices de mortalidade, especialmente em crianças (Schroeder and Hilbi 2008). Em nações industrializadas, a shigellose ocorre em locais onde há dificuldade em manter a higiene apropriada (Zychlinsky, Thirumalai et al. 1996), sendo mais afetados os indivíduos em instituições de custódia, crianças em creches, viajantes para outros países e homossexuais masculinos (Wiwanitkit 2006) (Niyogi 2005).

Normalmente, a shigellose desaparece em 5 a 7 dias, sendo que pessoas em bom estado nutricional e infecções leves se recuperam rapidamente e sem tratamento com antibióticos – apesar do tratamento matar as bactérias e reduzir a doença em alguns dias (CDC, 2009). Porém, em crianças desnutridas, a *Shigella* muitas vezes provoca um ciclo vicioso de nutrição ainda mais prejudicada, infecções recorrentes e posteriormente, retardo do crescimento (Niyogi 2005).

As epidemias e pandemias de disenteria severa geralmente são causadas por *S. dysenteriae*; *S. flexneri* é responsável pela shigellose pediátrica endêmica nos países em desenvolvimento; *S. boydii* é encontrada em focos endêmicos dispersos entre os países em desenvolvimento; e *S. sonnei* é a causadora da diarreia do viajante, da shigellose endêmica e surtos que ocorrem nos países desenvolvidos (Levine, 2007; Kotloff et al. 1999).

É considerada uma doença altamente infecciosa em função da baixa quantidade de inóculos necessários para iniciar uma infecção (a partir de 10 bactérias) (DuPont et al, 1989; Kotloff et al, 1999). A forma predominante de infecção é fecal-oral e comumente, a transmissão está relacionada à comida contaminada, água ou fômites (Niyogi, 2005). A patogênese da shigellose é caracterizada pela capacidade que *Shigella* spp. possui de invadir as células epiteliais da superfície mucosa do intestino humano (Sansone e Egile, 1998).

3. Patogênese celular de *Shigella* spp.:

A *Shigella* apresenta certo tropismo pelo tecido do cólon (Chamekh et al, 2008), pois os genes de virulência necessários para sua patogênese são transcritos em resposta a sinais térmicos, osmóticos e de pH que são característicos do intestino humano (Kane e Dorman, 2012). Ela consegue chegar ao seu destino após ser ingerida graças a um efetivo sistema de resistência que permite que ela sobreviva no ambiente ácido do estômago melhor do que os outros patógenos entéricos (Gorden e Small, 1993). Ao chegar ao trato intestinal, a *Shigella* é confrontada com o sistema de defesa da superfície do intestino, porém, ela possui uma estratégia de escape: alguns produtos bacterianos conseguem interferir nas vias de sinalização das células hospedeiras e regular a expressão de peptídeos antimicrobianos que são produzidos constantemente na superfície da mucosa do trato intestinal (Islam et al, 2001).

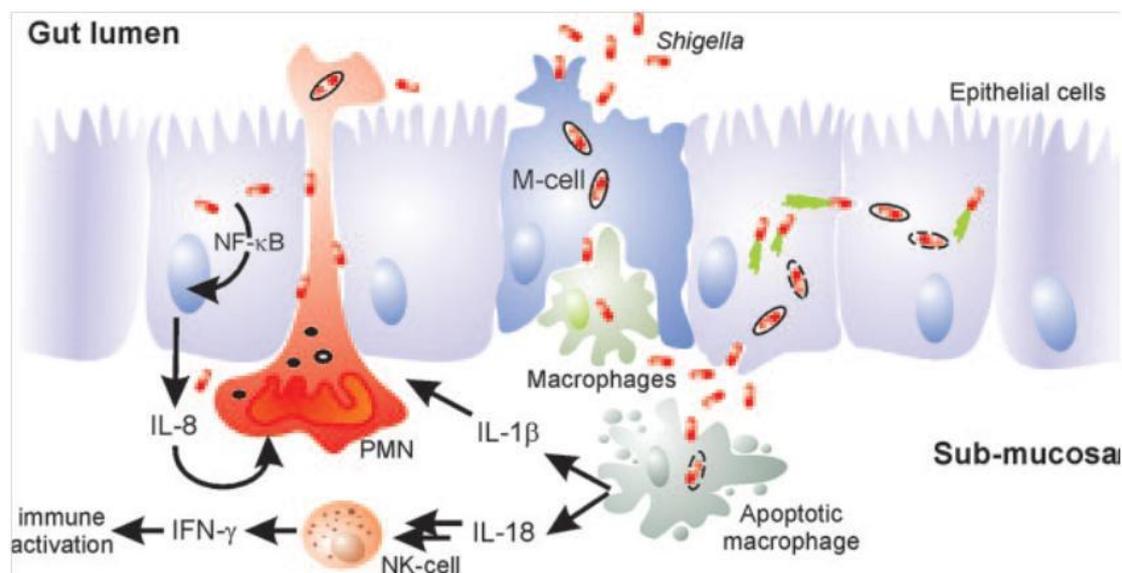


Figura 2 Entrada e disseminação da *Shigella* nas células epiteliais do intestino.

Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.

Para ganhar acesso à mucosa (Figura 2), a *Shigella* precisa atravessar a camada epitelial, que é uma barreira física com a função de proteger o corpo da invasão de

micro-organismos, comensais ou patogênicos (Sansone, 2004). Elas atravessam essa barreira em um processo chamado transcitose através das células M (*membranous epithelial cells*), que são células epiteliais especializadas que tem a função de continuamente retirar amostras de partículas do lúmen intestinal e entregá-las ao tecido linfóide subjacente, onde uma resposta imune pode ser iniciada caso seja necessário (Jennison e Verma, 2004).

Após a transcitose, a *Shigella* enfrenta outro sistema de defesa do nosso organismo: os macrófagos residentes, que tem a função de englobar e destruir todo o material que entra. Ela garante a sua sobrevivência induzindo rapidamente a morte do macrófago por apoptose, fato que é acompanhado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1beta e IL-18 e o início de uma massiva resposta inflamatória aguda (Schroeder e Hilbi, 2008).

Uma vez que o macrófago morre, a *Shigella* está livre e inicia a invasão das células epiteliais pelo lado basolateral, escapa do fagossomo e se multiplica no citoplasma. A movimentação dentro do citoplasma das células é feita através da polimerização de uma cauda de actina, semelhante a uma cauda de foguete, que propulsiona a bactéria através da célula. Assim que o ciclo se completa, inicia-se outro ciclo, com a invasão de uma nova célula, desta forma, a bactéria evita a exposição aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro (Schroeder e Hilbi, 2008). Porém, o mediador intracelular Nod-1 detecta a presença dos peptidoglicanos bacterianos e desencadeia uma cascata que resulta no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o sítio da infecção. Os PMN destroem a integridade da camada epitelial, permitindo que mais bactérias entrem na submucosa sem a necessidade de passar pelas células M (Jennison e Verma, 2004).

Portanto, a resposta imunológica desencadeada tem efeitos paradoxais, pois, ao mesmo tempo em que tenta combater a infecção, acaba atraindo mais bactérias para o local, exacerbando a infecção e a lesão do tecido. A severa destruição da camada epitelial do intestino resulta na deficiência de absorção de água, nutrientes e solutos, fatores que vão causar as características patológicas da shigellose: diarreia aquosa e aparecimento de sangue e muco nas fezes (Schroeder e Hilbi, 2008).

Ao usar a motilidade baseada em actina (Figura 3), a bactéria induz protrusões que invadem as células vizinhas. Depois da lise da protrusão e membrana celular, *Shigella* reinicia o seu ciclo intercelular e pode se espalhar pela monocamada celular sem nenhum passo extracelular (o que a protege da resposta imunológica do

hospedeiro). Tanto a entrada na célula quanto a motilidade intracelular são exemplos de como a bactéria manipula os processos que controlam a dinâmica do citoesqueleto da célula hospedeira. (Bourdet-Sicard et al, 2000; Heindl et al, 2010).

A *Shigella* induz a polimerização de actina no local de contato dela com a membrana da célula hospedeira, formando uma estrutura filopodial em torno da bactéria. Forma-se então uma densa rede de F-actina e vinculina (proteína de adesão focal que liga o citoesqueleto à membrana celular). Também estão envolvidas as proteínas sinalizadoras RhoGTPases, que são reguladoras essenciais dos processos celulares que envolvem reorganização do citoesqueleto; e as cortactinas, proteínas que ancoram os filamentos de actina. Toda esta estrutura desaparece quando a bactéria lisa a membrana e ganha acesso ao citosol da célula. (Bourdet-Sicard et al, 2000)

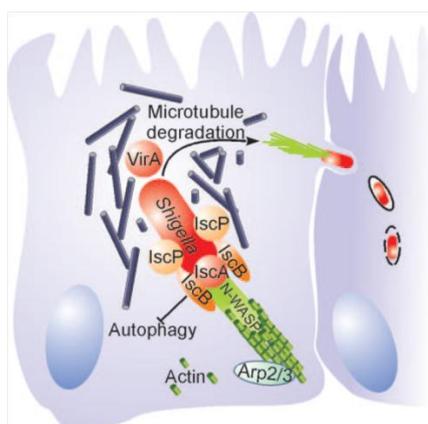


Figura 3 O complexo formado pela proteína *IcsA* da *S. flexneri* mais a proteína N-WASP da célula hospedeira, recruta outro, o Arp2/Arp3, que faz a mediação da nucleação para aumentar a cauda de actina. O movimento é facilitado por *VirA*, que abre caminho através da degradação dos microtúbulos da célula. A *Shigella* possui ainda a proteína *IcsB*, que impede o reconhecimento deste complexo e a autofagia.

Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.

4. Patogênese molecular de *Shigella* spp.:

Uma série de descobertas tem permitido o progresso na compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais as *Shigella* fixam-se às células epiteliais do intestino, invadindo a seguir as mesmas; acredita-se que o processo de patogênese desta

bactéria seja mediado por genes cromossomais e plasmidiais (Sansonetti, 2001; Sansonetti e, Phalippon, 1999).

O genoma bacteriano apresenta sequências denominadas ilhas genômicas, que se diferenciam do resto do genoma pelo seu teor de guanina e citosina, que foram adquiridas por transferência horizontal de genes e que codificam funções acessórias, como: atividades metabólicas adicionais, resistência a antibióticos, simbiose, propriedades envolvidas no *fitness* microbiano ou patogênese, sendo que, as regiões que carregam genes que codificam para um ou mais fatores de virulência, são chamadas de IPAs, ou ilhas de patogenicidade (Figura 4). Foram primeiramente descritas como regiões do DNA cromossomal, mas também podem ser parte de plasmídeos ou genomas de bacteriófagos. (Hacker e Kaper 2000)

No cromossomo de *Shigella* podem ser encontrados genes que regulam a expressão dos genes de virulência plasmidiais (como o *virR*, que codifica uma molécula responsável pela expressão dependente da temperatura das proteínas *Ipa* e *Mxi-Spa*); genes importantes para a sobrevivência da bactéria no trato intestinal (como os que codificam o LPS e sideróforos); além dos genes que codificam a Shiga toxina (*Stx*, ou *Evt*) e a enterotoxina 1 (*Shet1*) (Sansonetti, 2001; Niyogi, 2005).

S. dysenteriae é a única entre as espécies de *Shigella* a sintetizar uma poderosa citotoxina chamada toxina de Shiga (*Stx*). (Hale, 1991). Esta toxina pertence a uma família de citotoxinas que inclui a *Stx1*, essencialmente idêntica à *Stx*; e a *Stx2* com suas variantes (*Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e* e *Stx2f*), que são antigenicamente distintas e são sintetizadas pela *E. coli* produtora de *Stx* (STEC). Em ambas as cepas, os genes que codificam *Stx* estão cromossomicamente codificados e ligados a sequências de bacteriófagos lambdóides.

Existem evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais de que ocorra a transmissão horizontal do gene *stx* por bacteriófagos (através de conversão lisogênica, a transferência de genes de fagos para bactérias) entre *Shigella*, STEC e outras *Enterobacteriaceae*. (Greco et al, 2004). A toxina de Shiga fica localizada no espaço periplasmático intermembranas das bactérias e é liberada para o meio extracelular quando estas morrem. Ela age se ligando a receptores glicolipídicos na superfície das células eucarióticas, é internalizada e inibe a síntese de proteínas, resultando na morte da célula. Sendo que as infecções com bactérias produtoras de *Stx* são associadas ao desenvolvimento da síndrome hemolítico-urêmica, uma tríade de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falência renal (Bennish et al, 2006).

Ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas são antibióticos mais frequentemente prescritos para o tratamento da doença diarreica em adultos, e estudos da infecção de STEC em modelo animal sugerem que tanto estes quanto outros antibióticos podem induzir a resposta “S.O.S.” desta bactéria, resultando na indução da conversão lisogênica e aumento da expressão de Shiga toxina (Zhang, McDaniel et al. 2000).

Porém, em estudos realizados por Bennish, et al (2005) em pacientes com disenteria causada por *S. dysenteriae* tipo I, a concentração de Shiga toxina diminui após a administração de agentes antimicrobianos eficazes e o risco de síndrome hemolítico-urêmica é baixo. Diferente do que ocorre durante a infecção por STEC, a produção de Shiga toxina por *S. dysenteriae* tipo I não é aumentada por indução da conversão lisogênica porque o bacteriófago da *Shigella* é defeituoso e incapaz de se submeter à lisogenia. No entanto, a concentração de Shiga toxina extracelular pode aumentar após a morte por antibióticos e lise das bactérias, mas a carga de toxina não parece ser proeminente. (Bennish, Khan et al. 2006).

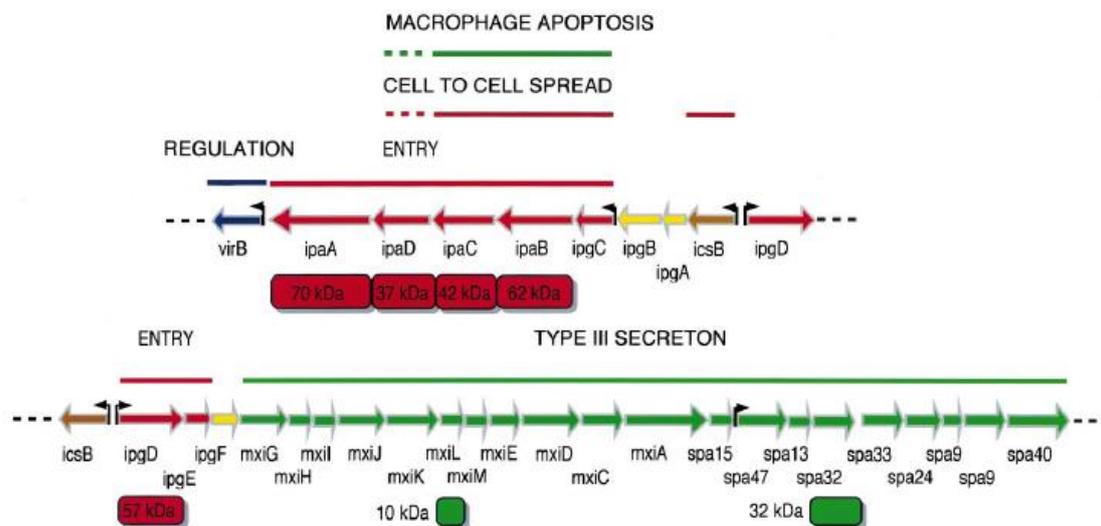


Figura 4 Mapa da ilha de patogenicidade de 30kb do plasmídeo.

Fonte: Sansonetti, 2001.

Todos os isolados virulentos de *Shigella* carregam um plasmídeo de 220kb que codifica o “fenótipo invasivo” destas espécies. As sequências codificantes estão espalhadas no plasmídeo inteiro, porém, há um bloco de 30kb que demonstra uma densidade particular de genes, o locus *Ipa/mxi-spa*, considerado a região central do

plasmídio e que é necessário e suficiente para causar a entrada da *Shigella* nas células epiteliais e levar o macrófago à morte. (Sansonetti, 2001).

Como os fatores de virulência interagem com a célula hospedeira, eles precisam ser expostos na superfície bacteriana ou transportados da célula bacteriana para a célula hospedeira; e para desempenhar esta função, as bactérias desenvolveram pelo menos cinco diferentes sistemas de secreção de proteínas, entre eles, o tipo 3, encontrado em *Shigella* spp. O T3SS utilizado por *Shigella* spp. (Figura 5) é codificado pelos genes *mxi* (membrane excretion of *Ipa*) e *spa* (surface presentation of invasion plasmid antigen), localizados em uma região de 30kb do plasmídio de virulência (Schmidt e Hensel, 2004). O T3SS é visualizado na microscopia eletrônica como uma estrutura macromolecular na superfície da bactéria, composta por um bulbo (provavelmente citoplasmático), um “pescoço” e uma agulha que se projeta no meio extracelular. Ele forma um poro de 25 Å na membrana da célula hospedeira.

O aparato *Mxi-Spa* é observado também em outras bactérias gram-negativas e tem a função de translocar efetores bacterianos para o citosol da célula hospedeira. Desta forma, os efetores da *Shigella* podem ter acesso direto à maquinaria que governa a dinâmica do citoesqueleto (Bourdet-Sicard et al, 2000). Os sintomas de doenças infecciosas, como a peste bubônica, febre tifóide, salmonellose, shigellose e diarreia infantil, dependem em grande parte do repertório de proteínas bacterianas injetadas pelo T3SS; sendo este sistema, evolutivamente bem conservado entre diferentes patógenos bacterianos.

O *status* do T3SS é modulado pelas variações de O₂ no ambiente, que variam nos sítios específicos do trato gastrointestinal. No anaeróbio lúmen intestinal, o T3SS pode estar presente, mas não competente para a secreção. Em contraste, a relativamente aeróbia zona adjacente à superfície da mucosa, pode permitir a ativação do T3SS neste local. Esta zona de oxigenação depende do suprimento vascular, provavelmente da difusão de O₂ da rede de capilares nas pontas das microvilosidades. (Marteyn et al, 2010).

A região central do plasmídeo de virulência também inclui: a) genes que codificam proteínas efetoras como as *Ipa*: *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*, *IpaD* e *IpgD*; b) genes *IpgC* e *IpgE* que codificam chaperonas citoplasmáticas requeridas para a estabilidade de *IpaB* e *IpaC*, e *IpgD*, respectivamente; d) o gene *virB*, que codifica uma proteína requerida para a transcrição dos genes do T3SS, para a regulação do *VirF* e de sua própria expressão; e e) genes adicionais de função desconhecida. Fora desta região,

citoesqueleto. Depois da lise do vacúolo, a *Shigella* monta em uma extremidade do seu corpo, uma estrutura rica em F-actina em forma de cauda de cometa para se mover intracelularmente. A própria polimerização da actina proporciona a força que direciona a bactéria através do citosol. Essa motilidade é mediada pela função da proteína IcsA/VirG.

A proteína *IpaB* é necessária para a regulação da secreção e pode funcionar como um sensor de célula hospedeira, sendo que deleções nesta região além de afetar a composição da “agulha”, podem levar à incapacidade de bloquear a secreção antes de receber o sinal de ativação, e conseqüentemente, afeta a habilidade de invadir células *in vitro* (Shen et al, 2010).

A proteína *IpaD* é um fator auxiliar requerido para a secreção efetiva das proteínas via *IpaB* e *IpaC*. *IpaD* é uma proteína efetora suplementar para a invasão da célula hospedeira. *VirA*, outra proteína efetora, tem a função de romper a rede de microtúbulos; e *VirB* é um ativador da transcrição de proteínas do T3SS. A proteína *IpaC* tem a função de induzir a polimerização de actina que leva à formação de estruturas filopodiais na periferia da célula (Bourdet-Sicard et al, 2000; Schroeder e Hilbi, 2008)

5. Mecanismo de indução de morte do macrófago:

Em 1997, Zychlinsky e Sansonetti publicaram um estudo propondo que a morte do macrófago induzida pela *Shigella* parece ser a chave intermediária, o link entre a infecção e a inflamação; esta morte aqui é denominada apoptose e é apresentada pelos autores como um evento pró-inflamatório resultante da ligação da proteína *IpaB* de *Shigella* à enzima ICE (que converte a forma inativa de IL-1 β em biologicamente ativa). Em 1998, Hilbi et al propuseram que *Shigella* induz a apoptose do macrófago por ativar a caspase-1 da célula hospedeira, através da ligação da proteína *IpaB*; concluindo que a apoptose induzida por *Shigella* é diferente das outras formas de apoptose (que dependem da ativação de outras caspases).

Nonaka e colaboradores (2003) realizaram ensaios com linhagens celulares macrófago-like (U937 e J774) infectadas com *Shigella* na presença de um inibidor de caspase-1; e concluíram que a caspase-1 tem efeitos apenas parciais na morte celular induzida por *Shigella* e que as caspases 3 e 7 não contribuem para esta morte. Através

de ensaio pelo método TUNEL, os autores observaram a fragmentação do DNA das células infectadas sem a prévia condensação do núcleo, fenômeno que caracteriza a necrose e não a apoptose.

O mecanismo de morte pode envolver a formação de um poro na membrana plasmática das células infectadas, que é dependente dos genes de virulência *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*. Nonaka et al ainda fizeram um experimento com células U937 em diferentes estágios de diferenciação, com diferentes níveis de expressão do marcador CD11b (marcador de superfície para macrófagos); e observaram que *Shigella* pode induzir necrose em células com alta expressão de CD11b e apoptose em células com baixo nível de expressão. Estas observações sugerem que a capacidade da *Shigella* de controlar a maneira com que ela mata as células, comandando mecanismos que levam à apoptose ou necrose.

Em 2005, surge um estudo de Koterski et al, com células HMDM (macrófagos humanos derivados de monócitos) infectadas com *Shigella* virulenta, confirmando que ocorre um rompimento da membrana celular precedido de uma queda abrupta nos níveis de ATP e um rápido colapso no potencial de membrana mitocondrial. Os autores concluem que este mecanismo de morte celular é mais similar à oncose ou necrose do que à apoptose e ocorre na ausência da fragmentação do DNA ou condensação do núcleo.

Também em 2005, Fink e Cookson publicaram uma revisão sobre os tipos de morte celular, propondo um melhor entendimento a respeito da diversidade de processos que medeiam a morte celular. Os autores definem apoptose como um processo de demolição programada que evita elicitar a inflamação, onde ocorre a condensação do núcleo e do citoplasma e a manutenção da membrana plasmática intacta, seguida da fragmentação celular em corpos apoptóticos que são fagocitados por outras células para que seja feita a reutilização dos componentes celulares. Neste processo, as caspases 2, 8, 9 e 10 iniciam a cascata de ativação e as caspases 3, 6 e 7 são responsáveis por desmontar a célula e clivar os substratos celulares.

O processo de oncose é acompanhado de edema celular, inchaço das organelas, bolhas e aumento da permeabilidade da membrana; e pode resultar da interferência na produção de ATP, consumo descontrolado de energia ou alterações nas concentrações de cálcio intracelular.

Já o termo necrose é utilizado para descrever a morte celular acidental resultante de perturbações no ambiente que resulta na liberação de mediadores inflamatórios; são

as mudanças que ocorrem após a morte celular, independentemente dos processos. Para a morte celular induzida por *Shigella* e também *Salmonella*, os autores sugerem um novo termo: piroptose, que descreve a morte celular programada pró-inflamatória, que depende unicamente da caspase-1 e ativa as citocinas IL-1 e IL-18.

Em 2008, Schroeder e Hilbi descreveram o processo de morte do macrófago (Figura 6) dizendo que a *Shigella* permite que o macrófago a capture e já dentro dele, secreta as proteínas *IpaB* e *IpaC* para escapar do fagossomo. A *IpaB* secretada se integra às membranas da célula de forma dependente do colesterol, iniciando a ativação proteolítica da caspase-1, que por sua vez, executa a morte celular liberando as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Estas citocinas liberadas do macrófago em processo de morte elicitam a forte inflamação característica da shigellose.

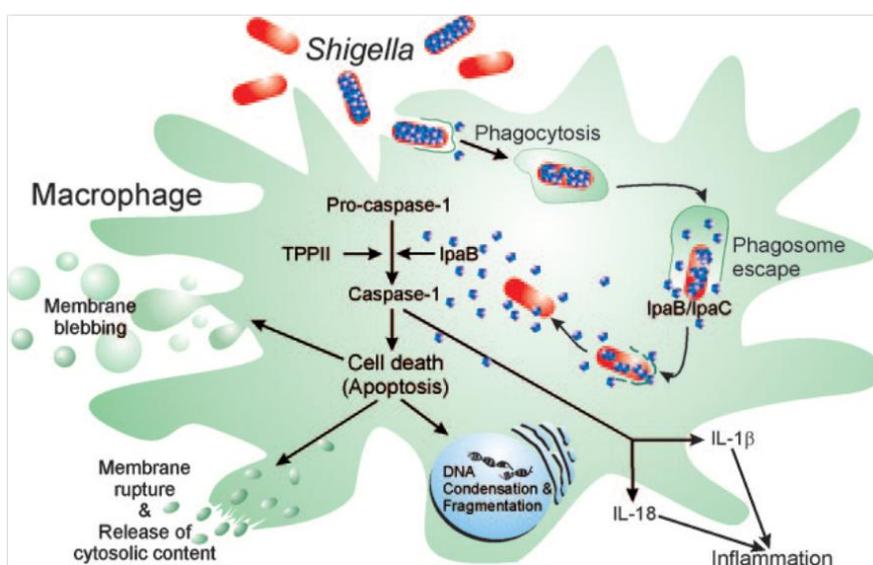


Figura 6 Processo de morte do macrófago induzido por *Shigella flexneri*.
Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.

6. *Shigella* no Brasil: dados epidemiológicos:

No Brasil, uma vez que a shigellose não é considerada uma doença de notificação compulsória, torna-se difícil estimar os índices de incidência (Peirano et al, 2006). Um breve panorama pode ser apresentado com os dados das pesquisas feitas, especialmente no Norte e Nordeste do país e no Estado de São Paulo. Segundo Sergio e

Leon (2009), *Shigella* está entre os micro-organismos mais frequentemente associados à diarreia em crianças, juntamente com rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Campylobacter jejuni* e *Cryptosporidium*. Como observado em outros países, no Brasil, a mortalidade por essas doenças também atinge maiores níveis nas regiões menos desenvolvidas (Sergio e Leon, 2009).

Um trabalho realizado em São Paulo (Souza et al, 2002) identificou *Shigella* como a terceira causa de diarreia em crianças (6% dos casos), sendo precedida por *Escherichia coli* (16,2% dos casos) e rotavírus (20,8% dos casos). Também em São Paulo, Andrade e colaboradores (1999) identificaram *Shigella* como segundo agente etiológico mais frequentemente isolado (12,5%) em crianças hospitalizadas com diarreia aguda que evoluíram para óbito, sendo precedida apenas por *Escherichia coli* (56,3%).

Em estudo feito no Nordeste do Brasil, foi encontrada *Shigella* em 8% dos pacientes com diarreia, rotavírus em 19,4% e *E. coli* em 23,5% (Guerrant et al, 1983). No Estado de Pernambuco, um estudo detectou *Shigella* em 4,18% de crianças aparentemente saudáveis, evidenciando o papel desempenhado pelos assintomáticos na propagação e manutenção dos agentes e processos entéricos (Leal et al, 1988). No Estado da Paraíba, *Shigella* foi isolada em 4% das crianças hospitalizadas com diarreia, sendo que esta bactéria juntamente com *E. coli* enteroinvasora (EIEC), foram os patógenos que provocaram maior proeminência de febre e sangue nas fezes (Moreno et al, 2010).

No Estado do Piauí, *S. flexneri* foi reportada como um patógeno comum encontrado em Teresina, sendo responsável por mais de 10% dos casos de diarreia aguda e detectado em crianças com até 24 meses de idade (Nunes et al, 2012). Em João Pessoa, Estado da Paraíba, *Shigella* foi responsável por 4,1% dos casos de diarreia estudados (Moreno et al, 2010). No Estado da Bahia, em estudo realizado com pacientes com diarreia severa, *Shigella* foi responsável por 54,3% dos casos (Diniz-Santos et al, 2005).

No Norte do Brasil são encontrados poucos estudos a respeito deste patógeno. No Estado do Amazonas são encontrados dois trabalhos pioneiros da década de 80, relacionados à prevalência de enteropatógenos nas infecções diarreicas de grupos indígenas (*Shigella* foi isolada em 4% e 4,2% dos indivíduos pesquisados), em locais onde era observada a prática rotineira de utilização dos cursos de água (rios, igarapés, etc.) para o asseio corporal, lavagem de utensílios e, eventualmente, emissão dos dejetos

humanos e animais (Linhares, 1992). Em estudo realizado no Estado do Pará, *Shigella* foi reportada como responsável por 13% dos casos de diarreia aguda em crianças com idade entre 0 a 5 anos (Linhares et al, 1983).

No Município de Porto Velho - Rondônia são encontrados dois estudos. Em 2001, foi relatado que o rotavírus era o patógeno mais frequente entre crianças com diarreia (19,2% dos casos) e *Shigella* estava presente em 7,7% dos casos. Porém, a presença desta última foi associada às formas mais graves da doença, onde foram observados episódios de vômitos (90%) e presença de sangue nas fezes (80% dos casos), fato que indica uma grave lesão da mucosa intestinal (Orlandi et al, 2001). Em 2006, os vírus também foram os patógenos mais frequentemente encontrados nas fezes de crianças com diarreia, incluindo 111 casos de rotavírus (23,6% dos casos de diarreia no total) e 30 casos de adenovírus (6,3%). O segundo grupo foi a *E. coli* diarreio genica (86 casos, 18,2%), seguido por *Salmonella* sp. (44 casos, 9,3%) e *Shigella* sp. (24 casos, 5,1%) (Orlandi et al, 2006).

7. Prevenção, antibióticos e vacinas:

A recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) para prevenção da shigellose e outras doenças diarreicas é que sejam tomadas medidas para evitar o espalhamento da bactéria nas comunidades e de pessoa para pessoa. Estas medidas incluem: a) lavar as mãos com sabão e, no caso da ausência deste, esfregar as mãos com terra ou cinzas; b) assegurar a disponibilidade de água potável (proteger a fonte de água da contaminação, cloração ou fervura e armazenamento correto); c) eliminação segura dos resíduos humanos (construção de sistemas sanitários adequados para as condições de cada comunidade); d) amamentar bebês e crianças pequenas (crianças amamentadas tem menos episódios de diarreia e quanto tem, são menos severos); e) manusear e processar os alimentos com segurança; e) controle de moscas.

Em relação à terapia com antimicrobianos, a WHO (2005) recomenda que a escolha do medicamento seja feita baseada nos dados recentes de susceptibilidade de cepas isoladas na região e caso estes dados não estejam disponíveis, devem ser observados os dados de países vizinhos e de recentes epidemias regionais. São recomendadas: ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas, pivmecillinam, ceftriaxona e

azitromicina. No entanto, já é possível encontrar relatos de aparecimento de cepas resistentes à ciprofloxacina na Ásia e nos Estados Unidos (Mensa et al, 2008; Pu et al, 2009; Ye et al, 2010; Folster et al, 2011; Xia et al, 2011).

O aparecimento de cepas de *Shigella* resistentes aos antibióticos comumente utilizados é devido ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e também à transferência horizontal de genes. Os padrões de resistência são influenciados pela localização geográfica, ano em que os isolados foram obtidos, classe dos agentes antimicrobianos e a pressão exercida pelo uso destes antibióticos (Peirano et al, 2006).

Várias tentativas de criar uma vacina eficaz têm sido feitas ao longo dos anos. Sabe-se que a imunidade adquirida naturalmente contra *Shigella* é sorotipo-específica, ou seja, a infecção por um tipo de *Shigella* fornece proteção contra re-infecção pelo sorotipo homólogo, o que faz da vacinação uma opção viável para se controlar a shigellose. Inicialmente, os consumidores da vacina seriam os 20 milhões de passageiros civis e militares que visitam os países em desenvolvimento; porém, um processo de fabricação simples e econômico (como no caso das vacinas vivas) poderia tornar viável a produção local nos países em desenvolvimento. Reduzindo a necessidade de intervenção médica e o uso de antibióticos, a vacina poderia ser uma ferramenta prática de saúde pública para o controle profilático em locais onde a shigellose é endêmica. (Coster et al, 1999; Jennison e Verma, 2004).

Uma vacina apropriada para a shigellose deve cumprir certos requisitos, como: ativar o sistema imune da mucosa e essa resposta deve ser de longa duração, induzir efeitos colaterais mínimos e ser simples de administrar (Jennison e Verma, 2004). As estratégias que já demonstraram eficácia são as cepas atenuadas de *Shigella* utilizadas em vacinas orais e os polissacarídeos O, ligados covalentemente a proteínas transportadoras; porém, existem outras que estão a ser estudadas mas que ainda não apresentaram evidência de proteção em humanos, como: *S. sonnei* inativada administrada via oral, proteossomos aos quais *S. flexneri* ou *S. sonnei* é adsorvida (administração intranasal), uma vacina parenteral feita com uma cepa atenuada e uma vacina intranasal chamada Invaplex (*Shigella* invasion complex) que contém proteínas do plasmídeo de invasão (Levine et al, 2007).

Os estudos realizados até o momento presente demonstram um avanço significativo, no entanto, para alcançar completamente a proteção contra infecções por *Shigella*, o desenvolvimento de vacinas polivalentes deve ser abordado para conferir

proteção contra múltiplos sorotipos (Jennison e Verma, 2004; Levine et al, 2007; WHO, 2009; Wu et al, 2011; Martinez-Becerra et al, 2012).

Em 1999, a WHO publicou um boletim no qual relatou a carga global das infecções por *Shigella* para que fossem feitas avaliações de custo-efetividade para orientar o desenvolvimento de vacinas e aplicação de estratégias de controle. Segundo este boletim, se uma vacina polivalente pudesse ser desenvolvida contra 100% dos sorotipos de *S. flexneri*, a adição de *S. sonnei* e *S. dysenteriae* tipo 1 pode fornecer proteção contra aproximadamente 79% das infecções por *Shigella* dos países em desenvolvimento e 83% dos países industrializados. Se essa vacina obtiver 70% de eficácia, até 91 milhões de infecções e 605 mil mortes poderiam ser evitadas por ano (Kotloff et al, 1999). Porém, em 2005, a WHO publicou outro documento afirmando que ainda não existem vacinas recomendadas para shigellose e, apesar de existirem várias em desenvolvimento, é improvável que sejam licenciadas antes de vários anos.

8. Identificação de cepas de *Shigella* sp.

Pode-se suspeitar da presença de espécies de *Shigella* nas culturas onde não ocorre fermentação de lactose e existe tendência à inércia bioquímica (Koneman, 2001), ou seja, são metabolicamente inativas, apresentando resultados negativos nos testes bioquímicos.

Elas são classificadas como uma espécie distinta do gênero *Escherichia* justamente por serem muito relacionadas às *E.coli*, sendo ainda mais complicada a diferenciação quando se trata da EIEC (*E.coli* enteroinvasiva) – que possui características bioquímicas de uma *E.coli*, porém, com a habilidade de causar disenteria utilizando o mesmo método das *Shigella* – sendo que ambas evoluíram do mesmo ancestral e formam um único patovar (van den Beld e Reubsæet, 2012).

No Brasil, a ANVISA (2004) recomenda que para a identificação de *Shigella* spp. sejam utilizadas as provas bioquímicas: fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, etc.), motilidade, utilização de citrato, descarboxilação de lisina, produção de H₂S, produção de CO₂, oxidase, produção de indol e de urease, produção de fenilalanina desaminase ou triptofanase, produção de gelatinase ou DNase,

utilização de aminoácidos (arginina e ornitina), hidrólise de esculina, ONPG (β -galactosidase), utilização de acetato e outras provas úteis (vermelho de metila, voges-proskauer, etc.). A ANVISA ainda recomenda que possam ser utilizados testes preparados no próprio laboratório, ou kits comerciais, métodos automatizados ou métodos rápidos cromogênicos para a detecção de enzimas.

A identificação de bactérias através da sequência de RNA 16S é bastante utilizada por ser uma região altamente conservada e fácil de amplificar, no entanto, para diferenciar espécies estritamente relacionadas como *Shigella* spp. *Escherichia coli*, vem sendo proposta a utilização do gene *gyrB* (subunidade B da DNA girase), que possui uma taxa de evolução molecular mais alta do que a do 16S (Fukushima et al, 2002; Wang et al, 2007; Wang et al, 2012).

Uma nova técnica que vem sendo utilizada para a identificação de bactérias (Bizzini e Greub, 2010; Alanio et al, 2011; Benagli et al, 2011, Sandrin et al, 2012) é a chamada MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization ou Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser), combinada com o sistema TOF (Time-Of-Flight ou Tempo de Voo), que se caracteriza de um método rápido para identificação das proteínas bacterianas por peso molecular, através da espectrometria de massas (Lay, 2001).

Em função da capacidade da *Shigella* sp. de invadir as células do epitélio intestinal, ensaios com células epiteliais in vitro são utilizados para estudo do potencial de virulência das cepas, dos fatores envolvidos na invasão celular e da relação patógeno-hospedeiro (Sansone et al, 1986, Cersini et al, 2003; Al-hasani et al, 2009; Bouzari, 2009; Bando et al, 2010; Chifiriuc, 2010; Ehsani et al, 2012, Walters et al, 2012). Ensaios in vivo com camundongos e cobaias também são utilizados para avaliar a virulência de cepas de *Shigella* sp., como o teste de Sereny (Cristea et al, 2009; Bedford et al, 2011).

JUSTIFICATIVA

As *Shigella* são enteropatógenos perfeitamente habilitados em chegar ao intestino do hospedeiro e colonizá-lo utilizando inclusive as defesas do hospedeiro ao seu favor. Elas são responsáveis pela shigellose ou disenteria bacilar, uma doença que pode levar o paciente a ter desde sintomas leves até um ciclo vicioso de diarreia e desnutrição, dependendo do potencial de virulência da cepa e também do estado nutricional do indivíduo. A shigellose pode ser facilmente prevenida em locais onde há acesso ao saneamento básico e a material básico de higiene, mas é possível encontrar vários locais onde este acesso é precário.

Na literatura os trabalhos envolvendo fatores de patogenicidade são baseados em modelos experimentais de infecção, geralmente coelhos, utilizando amostras de *Shigella* padrão e tudo que se conhece sobre o papel dos fatores de patogenicidade são baseados nestes modelos. Os poucos trabalhos realizados com isolados de *Shigella* selvagens na realidade são puramente epidemiológicos e analisam prevalências de fatores de patogenicidade geralmente com o intuito de buscar a identificação e a diferenciação de espécies de *Shigella*, ou em alguns interesses de ensaios vacinais.

São poucos os trabalhos que mostraram ou tentaram mostrar alguma associação entre fatores de patogenicidade, sintomatologia da shigellose pediátrica e isolados selvagens.

O presente trabalho traz uma contribuição enorme para o estudo das cepas de *Shigella* spp encontradas no município de Manaus- AM com relação às características das cepas circulantes e os sintomas apresentados em função da infecção. Pois os trinta e seis isolados utilizados neste estudo foram identificados numa pesquisa sobre a etiologia da diarreia infantil em crianças menores de 10 anos residentes da Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste da cidade no período de agosto de 2007 a julho de 2009 na qual 1500 crianças participaram e a *Shigella* foi a 4ª causa de diarreia.

Foi um trabalho árduo e necessário, pois para chegar a um numero de trinta e seis isolados de *Shigella* foram necessárias 1500 coletas. Por isso, é compreensível não encontrar estudos semelhantes na literatura.

Para o nosso entendimento, os achados encontrados neste estudo são corroborados com os dados da literatura, e o mais importante, eles consolidam alguns achados e abrem perspectivas para o nosso grupo de pesquisa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Caracterizar o perfil genotípico e fenotípico relacionado aos fatores de virulência de amostras de *Shigella* sp. isoladas de amostras de fezes de crianças com diarreia da cidade de Manaus – Amazonas, relacionando suas características com a sintomatologia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar os sorogrupos dos isolados e o perfil dos genes de virulência;
- Caracterizar o perfil de resistência a agentes antimicrobianos;
- Relacionar as características do perfil de genes de virulência com a sintomatologia dos pacientes e outros fatores como a idade e tempo de amamentação.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFAM e protocolado com o número 266/2006.

Foram utilizadas 36 cepas bacterianas isoladas previamente a este estudo, a partir de coleta realizada nos hospitais de Manaus (Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste) entre agosto de 2007 a julho de 2009, de 1.500 amostras de fezes de crianças com diarreia, com idade entre 0-10 anos. O acompanhante responsável pela criança foi primeiramente esclarecido a respeito da pesquisa e convidado a colaborar preenchendo o Termo de Consentimento e a Ficha de Dados Clínicos (apêndices).

Foi considerada como febre a temperatura axilar acima de 37,8°C, quando verificada no momento da avaliação clínica ou quando referida pela mãe. A desidratação foi diagnosticada pelo profissional médico responsável. A presença ou ausência de vômito foi relatada pelo responsável pela avaliação clínica. A presença de sangue nas fezes foi determinada após a passagem pelo Kit Fecacoult para sangue oculto nas fezes (Inlab diagnóstica).

Como padrão foi utilizada a cepa M90T de *Shigella flexneri*.

As amostras foram aliquotadas em placas nos meios: Agar MacConckey, Agar SS, Agar VB, Agar XLD; e identificadas em galeria bioquímica de: citrato, EPM e Mili.

Teste bioquímico: após crescerem em 3mL de meio BHI caldo por 24h a 37°C, as bactérias foram inoculadas em diferentes meios de cultura, onde permaneceram por mais 24h a 37 °C, para se observar a reação com diferentes substratos, sendo eles: meio EPM (produção de gás e H₂S, hidrólise de ureia e desaminação do triptofano), MILI (motilidade, descarboxilação de lisina e prova de indol); e meio para verificar a utilização ou não de citrato.

Sorologia: realizada através da técnica de aglutinação em lâminas com soros polivalentes espécie-específicos para os sorotipos de *Shigella* mais frequentes no Brasil, procedentes da PROMICRO: *S. sonnei* 1 e 2, *S. flexneri* polivalente, *S. dysenteriae* 2 e *S. boydii* 11. Os testes foram repetidos para confirmação dos resultados.

Para preservar as cepas, estas foram inoculadas em 3 ml de meio LB caldo e cultivadas a 37 °C durante 18 horas. Após a incubação, 50 µL deste meio com bactérias foi transferido para um tubo criogênico contendo 1 ml de meio definitivo, sendo feitas duas perfurações com uma agulha de platina; e cultivadas a 37 °C por mais 18 horas. Após a segunda incubação, foram adicionados 100 µL de óleo mineral. O preparo das amostras para os testes a seguir foi feito retirando alíquotas do meio definitivo, inoculando-as em meio LB caldo e cultivando-as a 37 °C durante 18 horas; sendo extraído o DNA de cada uma e armazenado a -20°C.

Caracterização do perfil de resistência a antibióticos

A técnica utilizada para o antibiograma foi descrita por Bauer et al (1996).

As amostras bacterianas crescidas em LB caldo foram diluídas em mais meio LB até atingirem a concentração de $1,5 \times 10^8$ células/mL. Posteriormente, foram inoculadas pelo método de alagamento em placas de Petri contendo o meio Agar Muller-Hunton. Foram dispostos nas placas os discos de papel contendo os agentes antimicrobianos (Newprov) e após 18 horas de incubação a 37 °C, os halos de inibição formados foram medidos. Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ceftriaxona, amoxicilina + ácido clavulânico, ciprofloxacina e ácido nalidíxico.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 3 mL de culturas que foram incubadas a 37 °C durante 18 horas, sob agitação constante. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 300µL de tampão TEM (Tris 1M, EDTA, NaCl 3M). Foram adicionados 30µL de lisozima (20 mg/mL) e esta solução foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 50µL de Triton X-100 a 10% e 20 µL de NaCl 3M, aquecendo a suspensão a 60°C em banho-seco, por 5 minutos. Foi adicionado 1µl de RNase (10mg/mL) e seguiu-se nova incubação por 15 minutos a 37 °C em banho-seco. Após esse período, foram adicionados 41µl de SDS a 10% e após homogeneização, 2,5µL de proteinase K (10mg/mL), seguido de nova incubação (37 °C/

15 minutos). Nesta etapa, foram adicionados 450µL de fenol e a suspensão foi agitada manualmente durante 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A fase aquosa foi recuperada e adicionada à 450µL de clorofórmio, sendo agitada manualmente durante 5 minutos. A solução foi novamente centrifugada (12.000 rpm/ temperatura ambiente/ 10 minutos), a fase aquosa foi novamente recuperada e adicionada à 41µL de NaCl 3M. Delicadamente foi adicionado 1µL de etanol 100% resfriado a -20 °C e novamente centrifugado (12.000 rpm/ temperatura ambiente/ 10 minutos) para que o DNA fosse recuperado e ressuspendido em 1 µL de etanol 70% (resfriado a -20 °C). Após uma última centrifugação, descartou-se todo o sobrenadante e o DNA foi ressuspendido em tampão TE (Tris-EDTA) e estocado a -20 °C.

Caracterização do perfil de genes de virulência

Os genes de virulência de *Shigella* estudados e seus respectivos primers estão descritos na Tabela 1. Foram utilizados 8 primers relacionados ao gênero *Shigella* e dois primers (*uidA* e *invE*) associados à invasão e encontrados também em *E.coli*.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: 40ng de DNA, tampão 5X, 0,25mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl₂, 5mM de cada primer, 2,5U de Taq DNA polimerase “High-fidelity” (Invitrogen) e água deionizada esterilizada para um volume total de 12,5µl. O programa de PCR utilizado em termociclador (Eppendorf) era composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de ciclo de 30 vezes composto de um passo de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura variável para cada gene por 45 segundos e um passo de extensão das fitas a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O passo de extensão final das fitas foi a 72°C durante 10 minutos, seguido do resfriamento a 4°C. A temperatura de anelamento foi de 59°C para os genes IpaBCD e IpaH, 56°C para invE e EVT, 57°C para Shet1A, Shet1B, 52°C para Shet2 e ial, 60°C para virF e 54°C para uidA.

Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em cubas horizontais, a 100V, em tampão TBE. Em cada canaleta foram aplicados 10µL do produto da reação de PCR, juntamente com 2µL do tampão de

ressuspensão 2X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado em transiluminador.

Tabela 1 Genes e primers utilizados no estudo.

Gene	Tamanho	Primer	Referência
<i>EVT</i>	100 pb	(u) CAACACTGGATGATCTCAG (d) CCCCTCAACTGCTAATA	(Faruque, Khan et al. 2002)
<i>Ial</i>	320 pb	(u) CTGGATGGTATGGTGAGG (d) GGAGGCCAACAATTATTCC	(Talukder, Mondol et al. 2007)
<i>IpaBCD</i>	500 pb	(u)GCTATAGCAGTGACATGGCTATAGCAGTG (d) ACGAGTTCGAAGCACTC	(Faruque, Khan et al. 2002)
<i>IpaH</i>	933 pb	(u) CTCGGCACGTTTAAATAGTCTGG (d) GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC	(Gómez-Duarte, Bai et al. 2009)
<i>Shet1A</i>	309 pb	(u) TCACGCTACCATCAAAGA (d) TATCCCCCTTTGGTGGTA	(Talukder, Mondol et al. 2007)
<i>Shet1B</i>	147 pb	(u) GTGAACCTGCTGCCGATATC (d) ATTAGTGGATAAAAATGACG	(Talukder, Mondol et al. 2007)
<i>Shet2</i>	799 pb	(u) ATGTGCCTGCTATTATTTAT (d) CATAATAATAAGCGGTCAGC	(Talukder, Mondol et al. 2007)
<i>VirF</i>	618 pb	(u) TCAGGCAATGAAACTTTGAC (d) TGGGCTTGATATCCGATAAGTC	(Gómez-Duarte, Bai et al. 2009)
<i>uidA</i>	1487 pb	(u) ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC (d) AAAGTGTGGTCAATAATCAGGAAGTG	(Müller et al, 2007)
<i>invE</i>	766 pb	(u) CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG (d) CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	(Müller et al, 2007)

RESULTADOS

Isolamento das cepas de *Shigella*:

Foram utilizadas 36 cepas bacterianas isoladas previamente a este estudo, a partir de coleta realizada nos hospitais de Manaus (Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste) entre agosto de 2007 a julho de 2009, de 1.500 amostras de fezes de crianças com diarreia, com idade entre 0-10 anos. Estes isolados foram armazenados em meio definitivo e posteriormente reativados para realização dos testes.

A prevalência dos sorotipos de *Shigella* encontrados em crianças com diarreia aguda atendidas em Manaus foi avaliada associando os dados clínicos com os fatores de virulência deste patógeno. Os testes bioquímicos e sorológicos realizados para a identificação convencional das espécies de *Shigella* demonstram que *S. flexneri* é a espécie mais frequente (65%), seguida por *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12,5%) e *S. dysenteriae* (2,5%),

Relação dos sintomas clínicos com a faixa etária e com os fatores relacionados à atenção à criança:

Entre as crianças que estavam com diarreia (100%), 83% delas apresentaram febre. O vômito foi relatado em 58,3% (21/36) pelas mães das crianças. A desidratação foi constatada durante anamnese em 63,8% (23/36) das crianças. Sangue visível e sangue oculto nas fezes foram observados em 33,3% (12/36) e 61,1% (22/36) das crianças, respectivamente.

A faixa etária das crianças foi abaixo de 10 anos, com a média de idade de 2,0 anos. O percentil 25% foi de 0,1 (mínimo) até 1,02 anos; o percentil 75% foi de 3,77 anos até a idade máxima de 9,5 anos. 59% das crianças ficaram na faixa etária entre 1,02 a 3,77 anos. A figura 7A representa uma distribuição quase normal da frequência etária destas crianças com diarreia.

Quando a idade foi comparada com os sintomas clínicos, não foram observadas diferenças em relação aos sintomas vômito, desidratação, sangue visível ou oculto; de

Ao analisar sangue visível, verificou-se o inverso, o grupo de crianças que apresentou este sintoma apresentou duração maior de diarreia. Estatisticamente as diferenças não foram significativas (teste de Mann Whitney; $P=0,0771$), contudo, visualmente é possível constatar uma tendência de que a duração da diarreia representaria um fator de risco agravante provavelmente na agressão da parede intestinal ao ponto de provocar eliminação de sangue visível nas fezes. No entanto, as diferenças mostradas na Figura 2XB com vômito e sangue visível não puderam ser confirmadas estatisticamente com o nosso número amostral para confirmar as interpretações acima.

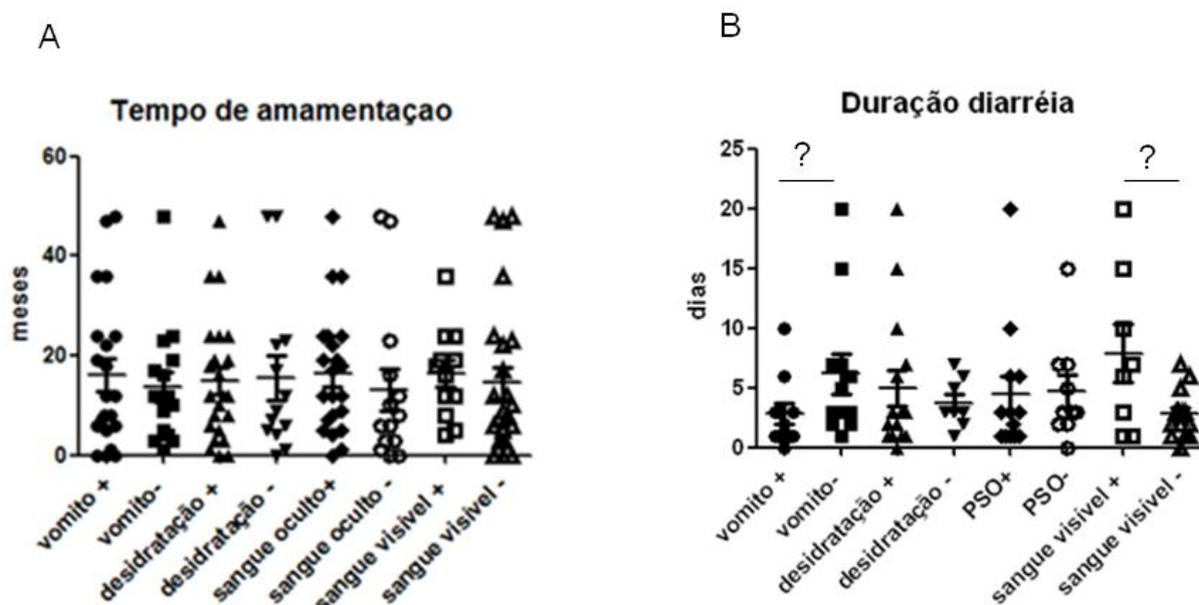


Figura 8 A) Relação entre o tempo de amamentação das crianças X sintomatologia da diarreia. B) Relação entre a duração da diarreia X sintomatologia.

Fatores de virulência e sintomatologia:

Como fatores de virulência analisados, foram escolhidos enterotoxinas de *S. flexneri* *Shet1* (subunidades 1A e 1B) e *Shet 2*, e a uma enterotoxina de *S. dysenteriae* a *Stx1* ou Shiga-like toxina, denominada aqui como *EVT*.

Como partes essenciais da maquinaria molecular necessária para a invasão bacteriana, alguns antígenos imunodominantes foram escolhidos, pertencentes a uma

família multigênica e localizados numa região do plasmídio de virulência denominada ilha de patogenicidade *Ipa*, (*IpaB*, *IpaC* e *IpaD*). O *ial*, sendo responsável por direcionar a penetração da bactéria nas células epiteliais, também foi escolhido; e ainda, o membro *IpaH*, importante na modulação da resposta imune.

Foram escolhidos fatores transcricionais *VirF* e *invE* codificados no plasmídio de virulência e reguladores que reconhecem desde alterações de temperatura corpórea, como alterações ambientais, até mesmo modificações após a entrada da bactéria no hospedeiro.

Foi usado um marcador (*uidA*) não associado a um fator de patogenicidade, utilizado para detecção de amostras de *Shigella* e EIEC, tendo como alvo o gene que codifica para a beta-glucoronidase, como uma espécie de marcador “neutro”.

O primeiro critério analisado foi a diarreia, pois todas as trinta e seis crianças que participaram do estudo relataram processo diarreico. A Figura 9 mostra as frequências encontradas após a tipagem por PCR das trinta e seis *Shigella* spp, segundo nossos primers, foi observada grande predominância de *Ipa BCD*, em 75% das amostras (27/36), seguido de *IpaH* e *Shet-1A* 55,5% (20/36) respectivamente, e depois *Shet-1B* 47.2% (17/36) dos isolados. *Shet-2*, *VirF* e *invE* apareceram com frequências de 36.1%, ou seja, em 13 amostras dos 36 isolados de *Shigella* coletados. Enquanto que o fator *Ial* apareceu na metade das amostras (18/36) e o *EVT* somente em 16%, (6/36).

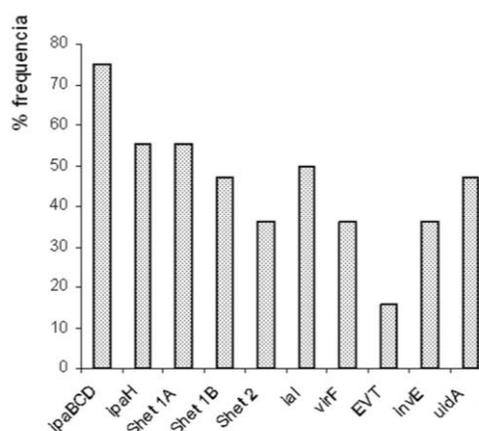


Figura 9 Frequência dos genes de virulência encontrados nas cepas de *Shigella* isoladas.

Um aspecto interessante a se destacar nesta análise preliminar, e que não envolve sintomatologia clínica, foi a baixa frequência de *EVT* ou a *StxI* (shiga-like) que é toxina de *S. dysenteriae*. Como esta espécie foi a menos encontrada em nosso estudo, acreditamos esta seria uma fortíssima razão para este achado.

Outros sintomas foram usados nas análises e comparados com as frequências das tipagem por PCR. Quando o sintoma febre foi analisado, não foram verificados alterações na frequência dos fatores de virulência que estivessem relacionados com os genes que codificam as proteínas de secreção tais como *Ipa BCD*, *Shet-1A*, ou com fatores de transcrição *VirF* ou *invE*, tampouco com o marcador *uidA* (Figura 10A). No entanto, dois fatores de virulência relacionados na modulação da resposta imune ou na resposta inflamatória induzida por células epiteliais no íleo de coelho, como são os exemplos de *IpaH* e *Shet-2*, respectivamente foram observados alterações na frequência dos fatores de virulência. O *IpaH+* nas crianças com febre apareceu em 60% (18/30) das amostras versus *IpaH+* sem febre 33,3% (2/6). O *Shet-2+* apareceu em 40,0% (12/30) das crianças com febre em comparação versus *Shet-2+* sem febre 16,6% (1/6). Houve redução sensível, entretanto estatisticamente não foi significativa.

Quando o sintoma desidratação foi avaliado, esperava-se encontrar diferenças na frequência das enterotoxinas *Shet-1* e *Shet-2* conhecidas por serem reguladas por ferro, pois é bem estabelecido que elas alterem o transporte de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, *in vitro* e *in vivo*. A Figura 10B mostra apenas redução considerável na frequência de *Shet-1B* entre as crianças com ou sem desidratação. *Shet-1* é um complexo proteico de 55 kDa que é codificado no cromossomo de exclusivamente por *Shigella flexneri* composto por duas subunidades *Shet-1A* e *Shet1B*.

Crianças com desidratação cujas *Shigella* apresentaram *Shet-1A+*, foram frequentes em 65.2% (ou seja, 15/23), versus em 38.4% dos isolados (5/13) do grupo das crianças que tiveram *Shet-1A+* porém sem desidratação. Da mesma forma, crianças com desidratação cujas *Shigella* apresentaram *Shet-1B+*, foram frequentes em 65.2% (15/23) versus em 7.6% dos isolados ou 1/13 das crianças sem desidratação ou apenas um isolado desse grupo que apresentou *Shet-1B+* (Figura 10B estrela).

O único isolado *Shet-1B* no grupo sem desidratação chamou a atenção, pois se tratava de uma criança que tinha 9,5 anos de idade.

Em relação ao *Shet-2*, crianças com desidratação cuja *Shigella* apresentaram *Shet-2+* foram frequentes em 39.1% ou 9/23 versus em 30.7% das crianças que tiveram isolado *Shet-2+* sem desidratação (4/13).

Para avaliar processo lesivo do intestino, o critério sangue nas fezes foi analisado. Em relação ao sangue visível, nenhuma redução na frequência dos fatores de virulência ficou evidente comparando o grupo de crianças com sangue visível nas fezes com aquelas que não apresentavam este sintoma (Figura 10C).

Utilizando um critério mais rigoroso e preciso, na qual é utilizada uma reação química para detecção do grupamento férrico da hemoglobina, foi possível verificar uma diferença na frequência de 72.7% (16/22) *Shigella* apresentando *IpaH*⁺ em crianças com diarreia com sangue oculto versus crianças diarreicas sem sangue oculto e *IpaH*⁺ 28.5% (4/14) (Figura 10 D, estrela). Em relação à *IpaBCD*, nenhuma diferença foi encontrada com as *Shigella* nos grupos de crianças de diarreicas com sangue oculto (*IpaBCD*⁺ 77.2% (17/22)) ou sem sangue oculto (*IpaBCD*⁺ 71.4% (10/14)). Nenhuma diferença foi encontrada com o fator *ial*, em ambos os grupos 50% *ial*⁺ 50% (11/22) crianças com sangue oculto e *ial*⁺ 50% (7/14) no grupo de crianças diarreicas sem sangue oculto nas fezes.

Na análise realizada com fator *ial*, não foi encontrada nenhuma evidencia que demonstrasse associação com algum sintoma analisado neste estudo.

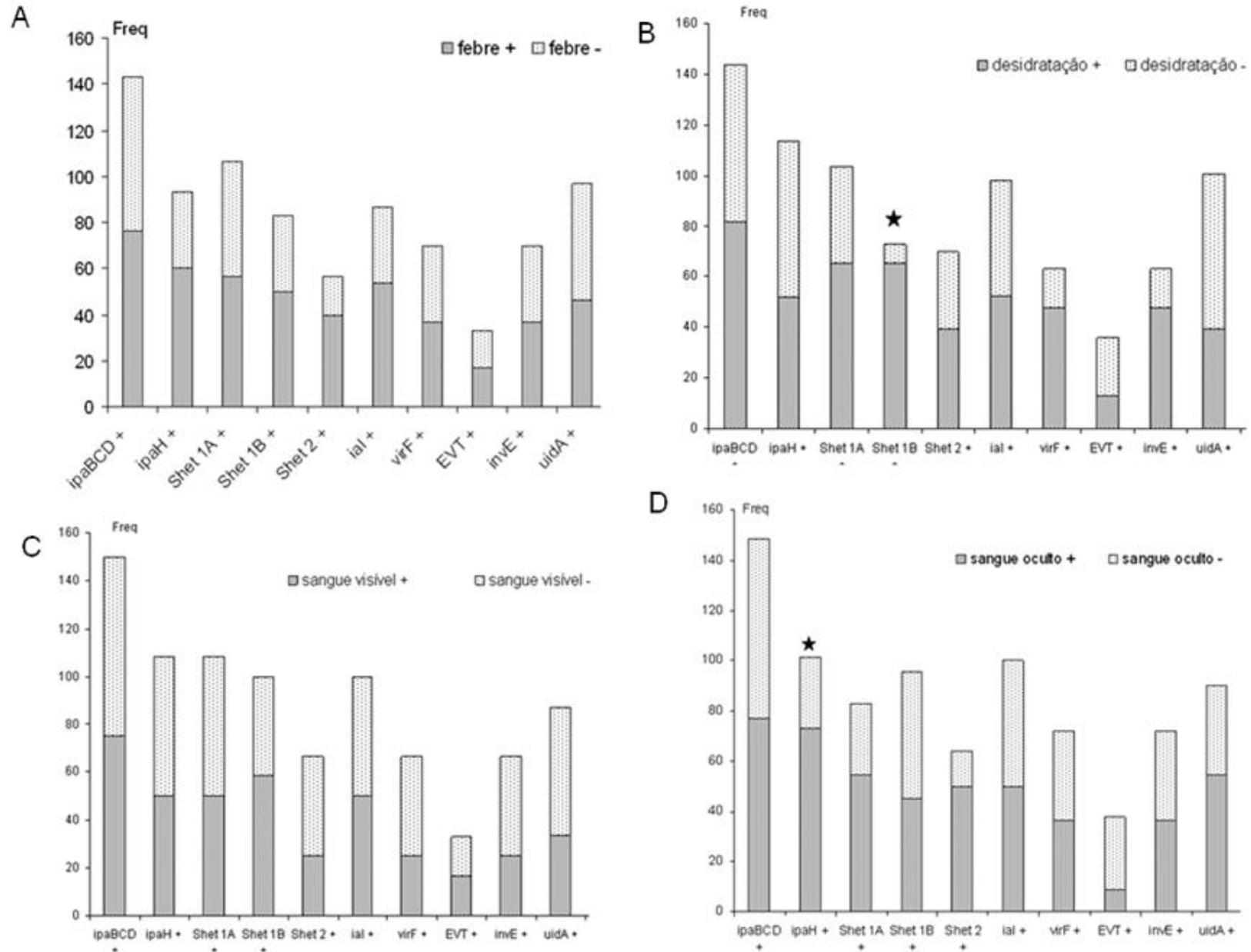


Figura 10 Relação entre a presença dos genes de virulência e os sintomas A) febre, B) desidratação, C) sangue visível, D) sangue oculto.

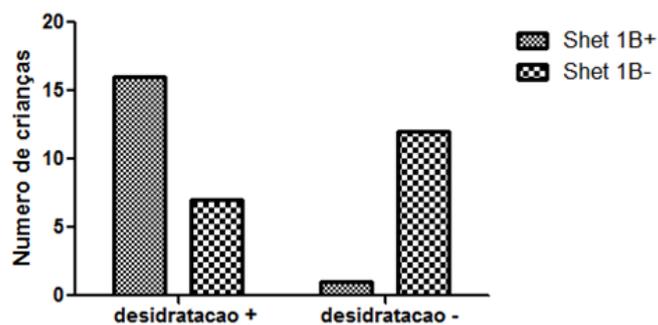
Associação entre Shet1B e desidratação:

As frequências de *Shet-1B* na Figura 10B mostraram uma redução considerável no grupo de crianças com desidratação. Para verificar se essa redução entre os grupos de crianças era significativamente diferente, nós submetemos análise de contingência. Como se pode verificar na Figura 11, a presença de *Shet-1B* (*Shet-1B+*) foi bem diferente quando se comparou as crianças que tiveram desidratação em relação às não desidratadas (16/1). Assim como, criança infectada com uma *Shigella* sem *Shet-1B* (*Shet-1B-*) parece uma característica da shigelose sem desidratação, segundo tabela de contingência e Figura 11 ($\chi^2 = 12.76$; alfa <0.05 ; $P=0.0004$).

Diante destes achados, algumas questões sobre fatores de risco associados a estes achados foram colocadas. Em relação às condições sanitárias, a falta de saneamento é um problema bem conhecido, cerca de menos de 7% da população da cidade de Manaus possui saneamento básico e todas as crianças participantes até o momento do estudo habitavam áreas desprovidas de saneamento. Portanto todas as crianças estavam sob influência de fator de risco facilitador.

A idade foi questionada para avaliar se ela seria um fator predisponente a desidratação nos grupos de crianças. Os grupos foram divididos em 4 e a média de idade das crianças de cada grupo foi distribuída de seguinte forma: com ou sem desidratação e com ou sem *Shet-1B* (Figura 12A). É preciso levar em consideração o predomínio da faixa etária das crianças (Figura 7A) que certamente poderia provocar um viés nesta análise. Contudo não foi observada diferença na média de idade, indicando idade não influenciou como fator predisponente.

Medidas para avaliar as condições de nutrição das crianças não foram usadas neste estudo. Como as crianças viviam em áreas sem saneamento básico, com fator de risco predisponente importante (idade), o tempo de amamentação foi perguntado para avaliar se ele poderia funcionar como uma atenuante, ou seja, influenciando inversamente a algum possível fator de risco agravante não previsto na pesquisa. Avaliando o tempo de amamentação das crianças, divididos em dois grupos (*Shet1B+* versus *Shet-1B-*), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 12B). A equivalência no tempo de amamentação nos dois grupos reforça o potencial do *Shet-1B* funcionando como um fator agravante à desidratação na shigelose.



 Shet 1B e desidratação

P value	0.0004
P value summary	***
One- or two-sided	Two-sided
Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes

Data analyzed	Shet 1B+	Shet 1B-	Total
desidratação +	16	7	23
desidratação -	1	12	13
Total	17	19	36

Figura 11. Associação entre a presença do gene Shet1B e a desidratação das crianças com diarreia,.

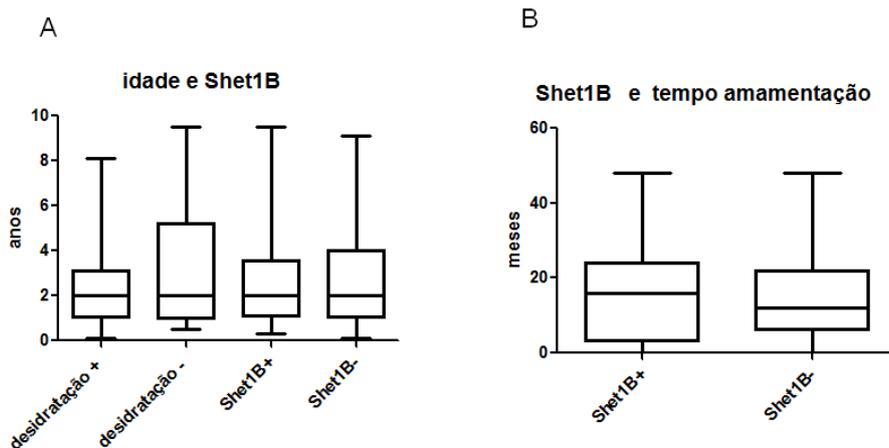


Figura 12. A) Relação entre a idade das crianças com diarreia como fator de pré-disposição à desidratação. B) Avaliação do fator tempo de amamentação como atenuante.

Shet-1 de *Shigella flexneri* é uma enterotoxina proteica de 55 kDa, podendo ser encontrada em outras espécies de *Shigella*, composto por duas subunidades *Shet-1A* e *Shet-1B* que são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano. Análise de contingência foi realizada para avaliar a influência do complexo *Shet-1* e suas subunidades separadamente em relação à desidratação. Para análise as crianças desidratadas versus sem desidratação foram separadas em quatro grupos de acordo com a presença ou não de *Shet-1A+* e/ou *Shet1B+* (Figura 13A). Segundo tabela de contingência ($\chi^2 = 13.65$; $P=0.0034$), como se esperava, a presença do complexo *Shet-1A+/Shet1B+* influenciou bastante como um fator agravante na desidratação, pois todas as *Shigella* que tinham o complexo provocaram desidratação (11/0). Mesmo algumas *Shigella* onde a existência do complexo não ficou evidente segundo a nossa tipagem (*Shet-1A-/Shet1B+*), a presença de *Shet-1B* foi associado ao sintoma de desidratação (5/1). O inverso, presença de *Shet-1A* e ausência de *Shet1B* (*Shet-1A+/Shet-1B-*) não influenciaram como fator agravante na desidratação na shigelose (Figura 13A).

É conhecido que a enterotoxina 2 (*Shet-2*) induz alterações na homeostase no íleo de coelho. Por último foi avaliado a combinação da enterotoxina *Shet-2* e *Shet-1B* na influência da desidratação na shigelose (Figura 13B). Segundo avaliação pela tabela de contingência ($\chi^2 = 12.98$; $P=0.0047$), pôde-se constatar que as *Shigella* contendo *Shet-1B+* influenciaram como um fator agravante, independentemente de presença de *Shet-2+*, segundo nossa tipagem de PCR.

É bem estabelecido que a subunidade *Shet-1A* é responsável pela a atividade secretora da subunidade *Shet-1B* que é reconhecidamente envolvida na ligação irreversível da toxina ao receptor enterócito. Por outro lado, *Shet-2* está relacionado à regulação da inflamação e processo febril.

Em relação às enterotoxinas os nossos achados indicaram apenas uma tendência entre em relação à *Shet-2* e processo febril observada na forma de uma redução da frequência, que não foi traduzida estatisticamente. No entanto, os resultados apresentados acima confirmaram quase que exclusivamente o potencial patogênico da subunidade *Shet-1B* associados ao processo de desidratação.

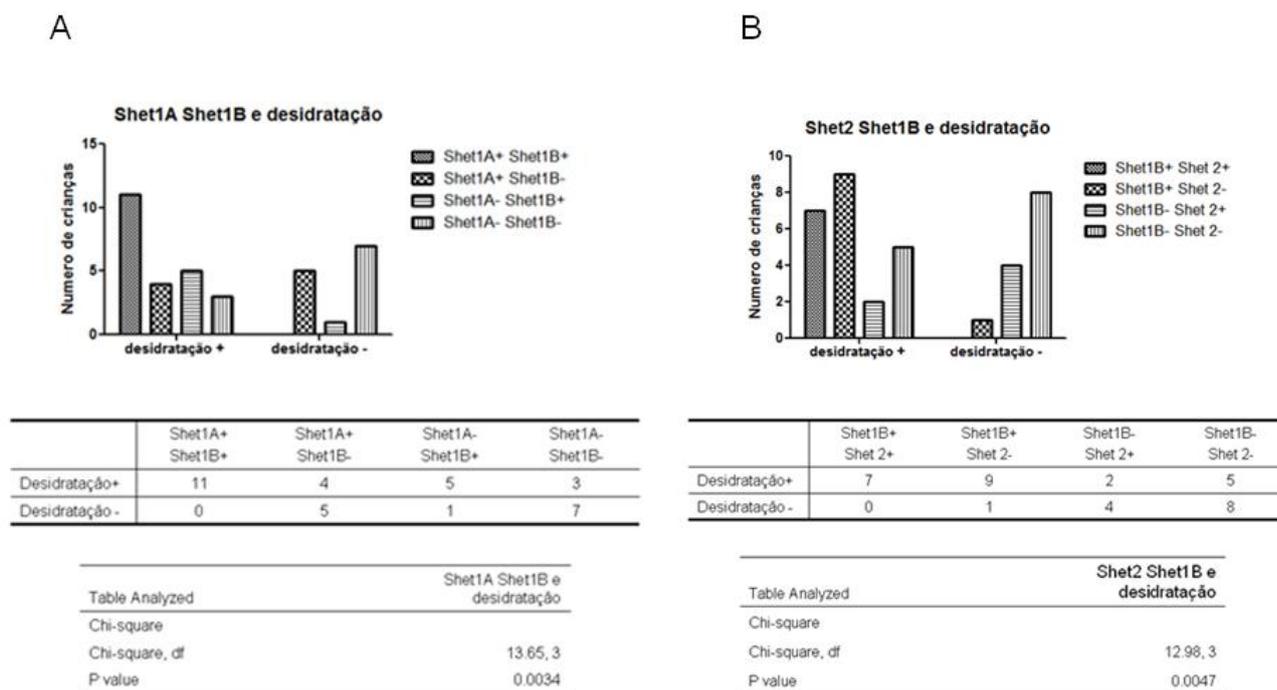


Figura 13. Relação entre a presença dos genes Shet1A, Shet1B e Shet2 com a desidratação das crianças.

Associação entre IpaH e sangue oculto:

A análise inicial mostrou que *IpaH* foi o segundo fator de virulência mais frequente, e ainda, diferenças nas frequências de *IpaH*⁺ foram observadas quando comparadas entre os grupos de crianças de acordo com o estado febril, embora elas não tenham sido estatisticamente significativas.

Ficou evidente a diferença na frequência de *IpaH*⁺ de *Shigella* em fezes diarreicas com sangue oculto em relação *IpaH*⁺ em fezes sem sangue oculto (Figura 10D, estrela). Por esta razão, foi submetida uma análise de contingência para avaliar se esta diferença era significativa. A análise confirmou que as crianças com diarreia sanguinolenta era provocada por *Shigella* carregando o fator de virulência *IpaH*, $\chi^2 = 12,75$; $P=0,0093$, (Figura 14).

Da mesma forma a idade foi questionada para avaliar se ela seria um fator predisponente ao sangue oculto e *IpaH*⁺. Não foi observada nenhuma diferença, indicando que a idade não influenciou como fator predisponente (Figura 15). Tempo de amamentação também foi comparado entre as crianças divididas em os grupos (*IpaH*⁺

versus *IpaH*-) e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Os dados de tabela de contingência de *IpaH*+ e sangue oculto e a equivalência no tempo de amamentação nos dois grupos de criança reforçam o potencial do *IpaH*+ como fator de virulência na shigelose.

As proteínas *IpaBCD* de *S. flexneri* são essenciais para a invasão da célula hospedeira, sobrevivência intracelular, controlam a secreção e translocação de outras proteínas para as células hospedeiras eucarióticas. A frequência dos genes que codificam estas proteínas foi muito grande. Cem por cento das crianças tiveram diarreia, sendo que a frequência de *IpaBCD*+ foi de 75,0%. Certamente, este conjunto de proteínas faz parte de uma maquinaria essencial para sobrevivência da *Shigella* na célula hospedeira.

Nenhuma associação com sintomatologia ficou evidente, mesmo quando a análise de contingência foi realizada com sangue oculto, a diferença não significativa (Figura 16). Sangue oculto indica hemorragia discreta caracterizada por um processo lesivo na parede epitelial do intestino provocada pela invasão da bactéria. Como *IpaH* é importante fator bacteriano modulador da resposta imune. Esta interação processo lesivo e *IpaH* modulando a resposta inflamatória acaba facilitando a invasão e conseqüentemente mais hemorragia nas fezes.

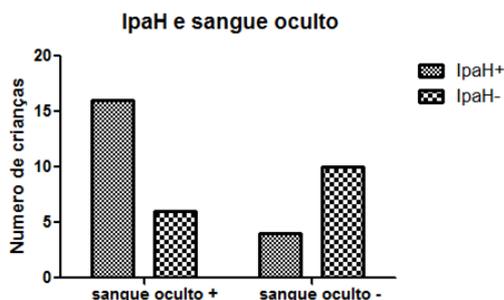


Table Analyzed	Ipas e sangue oculto		
Chi-square,	6.756		
P value	0.0093		
Data analyzed	IpaH+	IpaH-	Total
sangue oculto +	16	6	22
sangue oculto -	4	10	14
Total	20	16	36

Figura 14 Avaliação da presença do gene *IpaH* em *Shigella* isoladas de fezes de crianças com diarreia sanguinolenta.

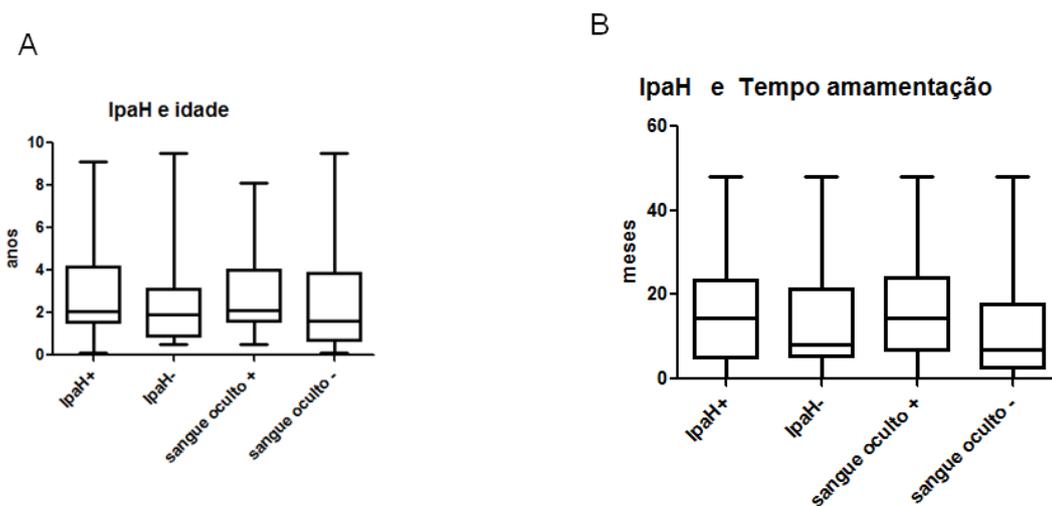
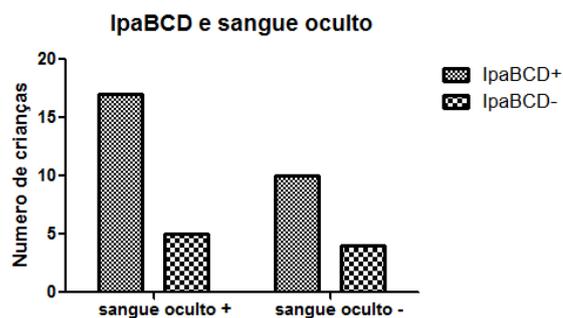


Figura 15. Avaliação da idade como fator de pré-disposição ao aparecimento de sangue oculto nas fezes e a presença do gene IpaH.



IpaBCD e sangue oculto

Table Analyzed

Fisher's exact test

0.7115

P value

No

Statistically significant?
(alpha<0.05)

Data analyzed

sangue oculto +

sangue oculto -

Total

	IpaBCD		Total
	IpaBCD+	-	
sangue oculto +	17	5	22
sangue oculto -	10	4	14
Total	27	9	36

Figura 16. Avaliação entre a sintomatologia e a presença dos genes IpaBCD.

***VirF* e *VirB*: análise da função reguladora.**

A patogenicidade da *Shigella* é mediada por um sistema de secreção proteínas tipo III (T3SS) codificada no plasmídeo de virulência na qual injeta moléculas efetoras no epitélio do hospedeiro durante a infecção (Dorman & Porter, 1998). A expressão deste T3SS é estreitamente regulada por duas proteínas, *VirF* e *invE*. *VirF* é um tipo de fator transcrição codificado no cromossomo e um ativador-regulador da transcrição do *invE*. O *invE* por sua vez é mais conhecido como *virB* (Adler et al, 1989; Kato et al, 1989) também é um fator de transcrição codificado no plasmídeo e ativa a transcrição de *mxi* e genes que codificam os componentes do T3SS (Beloin & Dorman, 2003).

A tipagem de PCR mostrou que todos os isolados de *Shigella invE+* tinham os genes *IpaBCD+* (n=13) e a maioria (n=9) tinha *IpaH+* (Figura 17A). Em contra partida, foram encontradas vinte três isolados sem *invE* (*invE-*), mas em boa parte deles foi encontrada os genes *IpaBCD* (n=14) e *IpaH* (n=11). Paralelamente, a tipagem de *VirF* mostrou resultados semelhantes (Figura 17B), os genes *IpaBCD* foram encontrados em todos os isolados *VirF+* (n=13) e *IpaH* na maioria destes isolados (n=8). Nos isolados *VirF-*, os genes *IpaBCD* e *IpaH* também foram encontrados (n=14 e n=12, respectivamente). Os isolados *invE+* e *VirF+* (n=8) foram todos *IpaBCD+* e em cinco deles foram encontrados *IpaH+* (dados não mostrados).

Segundo a literatura, que é baseada em amostras padrão, o fator de transcrição *VirF* é um tipo de regulador-ativador da transcrição do *invE*, que por sua vez ativa a transcrição de *mxi* e genes dos componentes do TTSS (por exemplo os *Ipas*). Os resultados deste trabalho baseiam-se em isolados selvagens e indicam que o controle de regulação e transcrição talvez possa ser realizado por outros circuitos (Figura 17 A-C).

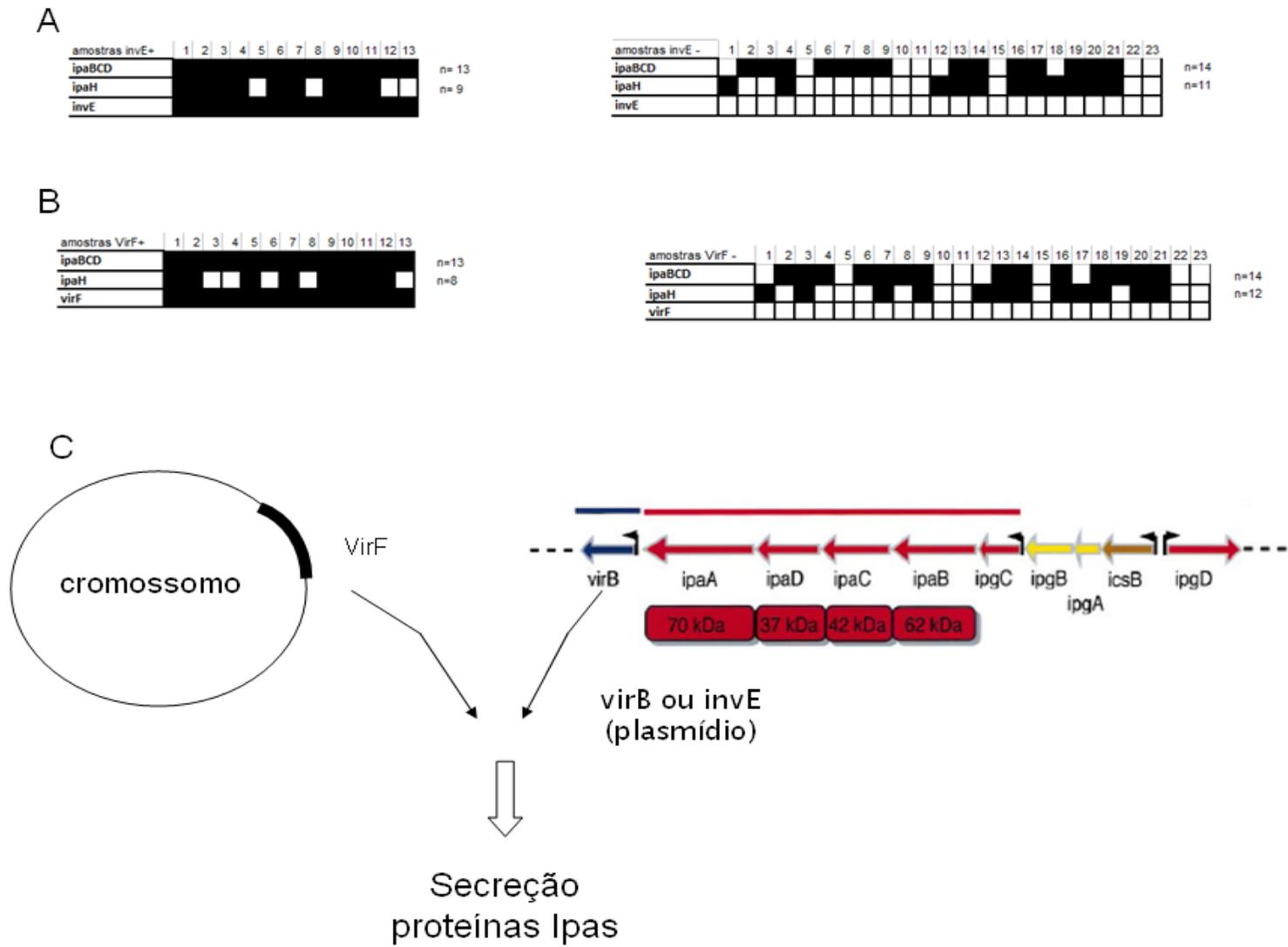


Figura 17. Análise da função reguladora dos genes VirF e VirB.

Perfil de resistência a antimicrobianos:

Os isolados foram testados quanto à sensibilidade a 9 antimicrobianos, sendo eles: AMC - amicacina + ácido clavulânico , AMP - ampicilina, CIP - ciprofloxacina, CLO - cloranfenicol, CRO - ceftriaxona, GEN - gentamicina, K - kanamicina, NAL - ácido nalidíxico, TET - tetraciclina.

Foi observado que 100% dos isolados (35/35) se mostraram sensíveis à kanamicina e ao ácido nalidíxico. Poucos isolados apresentaram resistência intermediária aos agentes, sendo 9% (3/35) à amicacina + ácido clavulânico, 3% (1/35) à ampicilina, 3% (1/35) à ciprofloxacina, 11% (4/35) ao cloranfenicol, 3% (1/35) à ceftriaxona, 6% (2/35) à gentamicina e 3% (1/35) à tetraciclina.

Outros isolados apresentaram resistência total aos agentes, sendo 3% (1/35) resistentes à + ácido clavulânico, 34% (12/35) à ampicilina, 14% (5/35) ao cloranfenicol, 6% (2/35) à gentamicina e 86% (30/35) à tetraciclina.

A cepa controle M90T se mostrou sensível a todos os antimicrobianos com exceção da tetraciclina, à qual demonstrou resistência intermediária.

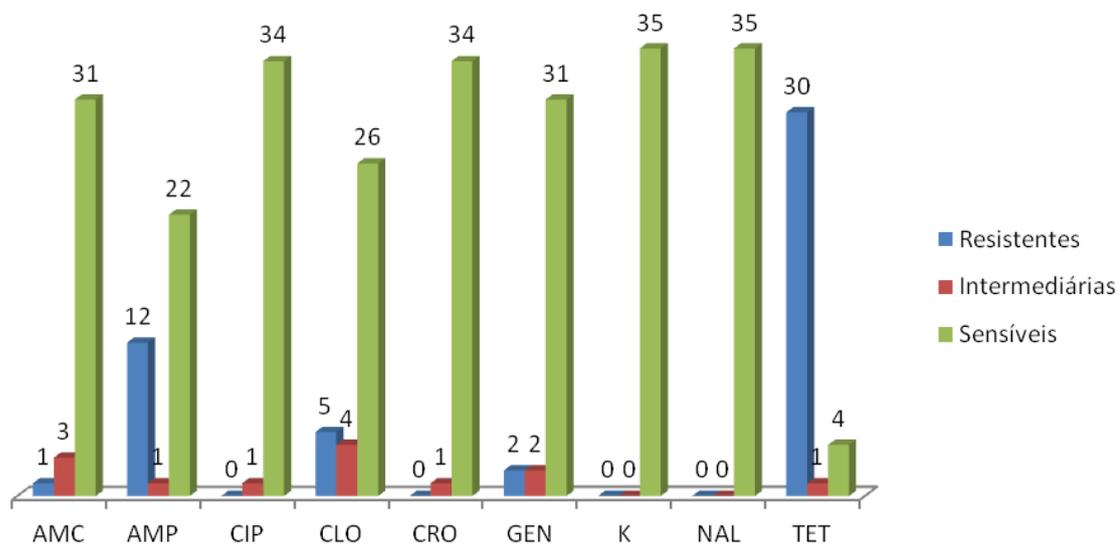


Figura 18. Perfil de resistência a antimicrobianos.

DISCUSSÃO

Caracterização do perfil bioquímico e sorológico:

A shigelose é uma doença manifestada desde uma leve diarreia até uma severa disenteria, caracterizada pela passagem em pequenos volumes de fezes podendo conter sangue, muco e leucócitos fecais (Angelini et al, 2009). Segundo a literatura, as epidemias e pandemias de disenteria severa foram causadas por *S. dysenteriae* enquanto que *S. flexneri* tem sido frequentemente associada à shigellose pediátrica endêmica nos países em desenvolvimento. Por outro lado, a espécie *S. boydii* tem sido encontrada em focos endêmicos dispersos e a *S. sonnei* causadora da diarreia do viajante nestes mesmos países. Entretanto, shigellose não é exclusividade de países em desenvolvimento, pois surtos têm sido reportados em países desenvolvidos (Levine, Kotloff et al. 2007).

No presente estudo, trinta e seis isolados de *Shigella* spp oriundos de uma pesquisa na qual se investigou a etiologia da diarreia infantil de um total de 1500 crianças na zona leste-sul-oeste de Manaus, no período de agosto de 2007 a julho de 2009. A identificação convencional confirmou a *Shigella flexneri* sendo a mais freqüente (65%), como é reportado na literatura a shigellose pediátrica. No entanto, não menos importantes foram os achados de *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12,5%) e *S. dysenteriae* (2,5%) na incidência da shigellose pediátrica. Os resultados da identificação bioquímica e sorológica obtidos condizem com o observado nas demais localidades do Brasil, com a predominância de *S. flexneri* e em segundo lugar, *S. sonnei* ou *S. boydii* e, por último, *S. dysenteriae* (Souza et al, 2002; Peirano et al, 2006; Silva et al, 2008; Bastos e Loureiro, 2011; Nunes et al, 2012). Estes dados estão de acordo com estudos que dizem que *S. flexneri* é a espécie mais comum em países em desenvolvimento, sendo a *S. sonnei* a mais comum em países mais desenvolvidos e industrializados (Kotloff et al, 1999; Penatti et al, 2007).

Caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos:

A utilização de agentes antimicrobianos e os fatores ambientais de transmissão tem um importante papel no surgimento e na disseminação dos mecanismos de

resistência a antibióticos (Krummennauer et al, 2012). O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e a transferência horizontal de genes têm levado ao aparecimento de cepas de *Shigella* resistentes aos antibióticos comumente utilizados; sendo que os padrões de resistência são influenciados pela localização geográfica, ano em que os isolados foram obtidos, classe dos agentes antimicrobianos e a pressão exercida pelo uso destes antibióticos (Peirano et al, 2006).

A WHO (2005) recomendou que a escolha do medicamento fosse feita baseada nos dados recentes de susceptibilidade de cepas isoladas na região e caso estes dados não estejam disponíveis, devem ser observados os dados de países vizinhos e de recentes epidemias regionais, entretanto, em casos de shigellose, são recomendados: ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas, pivmecillinam, ceftriaxona e azitromicina.

Todas as cepas isoladas neste estudo se mostraram suscetíveis à kanamicina e ao ácido nalidíxico. Alguns isolados apresentaram resistência intermediária aos agentes e dentre estes é importante destacar o aparecimento de um isolado resistente (intermediária) à ciprofloxacina e 1 resistente (intermediária) à ceftriaxona, que são os antibióticos recomendados pela OMS.

Em um estudo realizado em Teresina-PI com cepas de *Shigella* isoladas entre 2004 e 2007, todas elas foram sensíveis ao ácido nalidíxico, à ciprofloxacina e à ceftriaxona, apresentando resistência aos outros antimicrobianos testados (Nunes et al, 2012). No estado do Pará foram estudadas cepas de *Shigella* isoladas entre 1979 a 2009 e todas elas também se mostraram suscetíveis à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico, além da cefotaxima, ceftazidima e nitrofurantoína; apresentando resistência aos outros antimicrobianos testados (Bastos e Loureiro, 2011). Estes dados contribuem para o monitoramento das cepas regionais de forma a garantir tratamentos eficazes para os pacientes; e é de suma importância que este monitoramento seja frequente para observar o surgimento de novas cepas resistentes.

Fatores de virulência associados à shigellose pediátrica:

Dependendo do estado nutricional a shigellose desaparece em poucos dias e a recuperação é rápida (CDC, 2009). No entanto, nos casos de desnutrição as infecções podem ser recorrentes e causar retardo do crescimento (Niyogi 2005). Embora neste estudo não tenha sido usados critérios nem parâmetros para avaliar as condições

nutricionais das crianças, como boa parte das crianças eram bem jovens, foi analisado o tempo de amamentação. Este critério, além de sugerir um risco menor à desnutrição, sendo recomendado pelo Ministério da Saúde e UNICEF (MS, 2007) em função de vários benefícios que esta prática traz (entre elas, a capacidade de proteger o bebê contra doenças como a diarreia); poderia associar algum efeito protetor contra alguma sintomatologia detectada durante ou após a anamnese. Chisti et al (2010) relataram que bebês amamentados possuem mais capacidade de resistir à complicações resultantes do agravamento da infecção por *Shigella*, como convulsões, encefalopatia, nanismo e morte. Neste estudo, nenhuma criança participante apresentava quadro grave de shigelose pediátrica, demonstrando que este fator não influenciou como um fator de risco facilitador a severidade. Em contra partida quando as crianças foram agrupadas de acordo com os sintomas vômito, desidratação e sangue nas fezes, o tempo de amamentação não contribuiu para atenuar estes sintomas.

A shigelose é uma patologia característica de locais sem saneamento básico ou mesmo onde há dificuldade em manter a higiene apropriada (Zychlinsky, et al. 1996; Wiwanitkit 2006; Niyogi et al. 2005). O acesso limitado à água limpa e a falta de intervenção médica apropriada contribuem para os altos índices de mortalidade, especialmente em crianças (Schroeder and Hilbi 2008). A falta de saneamento é um problema bem conhecido da cidade de Manaus, pois apenas uma parcela inferior 7% da população possui saneamento básico. Como todas as crianças participantes habitavam áreas desprovidas de saneamento, elas estavam sob influência de fator de risco facilitador.

A patogênese da shigelose se deve às ilhas de patogenicidade (*IPAs*) no genoma da *Shigella*, que foram primeiramente descritas no DNA cromossômico, mas também em plasmídios e bacteriófagos. (Hacker e Kaper 2000). Estes fatores de virulência compreendem um sistema de secreção proteínas tipo III (T3SS) e moléculas efetoras no epitélio do hospedeiro, que são essenciais para a invasão e sobrevivência da bactéria no meio intracelular, como na modulação da resposta das células hospedeiras (Dorman & Porter, 1998; (Sansone e Egile, 1998). A expressão deste T3SS é estreitamente regulada por duas proteínas, *VirF* (fator transcrição do cromossomo) e *invE* (fator de transcrição codificado no plasmídio) (Adler et al, 1989; Kato et al, 1989; (Beloin & Dorman, 2003). Segundo a literatura que é baseada em amostras padrão, o fator de transcrição *VirF* é um tipo de regulador-ativador da transcrição do *invE*, que por sua

vez ativa a transcrição de *mxi* e genes dos componentes do TTSS (por exemplo os *Ipas*). A tipagem mostrou o que se esperava a presença de *IpaBCD*⁺ em todos *virF*⁺ e/ou *invE*⁺. Entretanto em outros isolados *IpaBCD*⁺, foram encontrados *virF*⁻ ou *invE*⁻. Em relação ao *IpaH*⁺, aqui foi avaliado apenas um dos cinco genes *IpaH* contido no genoma de *Shigella*. Nossos resultados baseiam-se em isolados selvagens e indicam que o controle de regulação e transcrição possa ser realizado por outros circuitos.

A região central do plasmídio de virulência inclui genes do *Ipa* que codificam proteínas efetoras e chaperonas citoplasmáticas dentre eles a *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*. As proteínas *IpaB* e *IpaD* são necessárias na composição da “agulha” da T3SS e portanto, essenciais na secreção e ainda importantes na invasão na célula hospedeira (Shen et al, 2010). A proteína *IpaC* por sua vez, tem a função de induzir alterações na célula hospedeira (Bourdet-Sicard et al, 2000; Schroeder e Hilbi, 2008). Infecção de *Shigella* e inflamação no tecido seria provocado via ligação da proteína *IpaB* causando a morte do macrófago induzida por apoptose via caspase-1, com liberação de IL-1 β biologicamente ativa (Zychlinsky e Sansonetti 1997; Hilbi et al. 1998). O mecanismo de morte pode envolver a formação de um poro na membrana plasmática das células infectadas, que é dependente dos genes de virulência *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*.

As proteínas *IpaBCD* de *S. flexneri* são essenciais para a invasão da célula hospedeira, sobrevivência intracelular, controlam a secreção e translocação de outras proteínas para as células hospedeiras eucarióticas. A diarreia foi a característica clínica apresentada em todas as trinta e seis crianças que participaram deste estudo e a tipagem mostrou que *IpaBCD* foram os fatores de virulência mais predominantes seguido de *IpaH*.

Quando o critério febre foi comparado, alteração na frequência de *IpaH* foi observada corroborando com seu papel na modulação da resposta imune de células epiteliais no íleo de coelho, conforme encontrado na literatura. A análise de contingência baseada no critério de sangue oculto, indicou que *Shigellas* carregando o fator de virulência *IpaH*⁺, importante fator bacteriano modulador da resposta imune inflamatória, provocavam um processo invasivo levando a um quadro de diarreia sanguinolenta. Estes resultados são coerentes segundo a literatura, pois isolados carregando tais genes os tornariam “fenotipicamente invasivos” e capazes de modular a resposta do hospedeiro (Sansonetti, 2001).

No cromossomo de *Shigella* podem ser encontrados genes que codificam enterotoxinas, tais como a Shiga toxina (Stx) da *S. dysenteriae* - única entre as espécies

de *Shigella* a sintetizar uma poderosa citotoxina (Hale, 1991). Em ambas as cepas, os genes que codificam *Stx* estão cromossomicamente codificados e ligados a sequências de bacteriófagos lambdóides. Neste estudo a prevalência de *S. dysenteriae* foi muito baixa, mesmo assim a *Stx1* (shiga-like) foi detectada. A enterotoxina *Shet-1* de *Shigella flexneri* é uma proteína de 55 kDa, composta por duas subunidades (*shet-1A* e *shet-1B*) codificadas no cromossomo bacteriano e podendo ser encontrada em outras espécies de *Shigella* (Sansonetti, 2001; Niyogi, 2005).

É bem estabelecido que as enterotoxinas, principalmente as *Shet-1* e *Shet-2*, alteram o transporte de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, *in vitro* e *in vivo*. Era esperado encontrar diferenças na frequência dos genes que codificam para as enterotoxinas quando o sintoma desidratação fosse avaliado. Análise de contingência avaliou a influência do complexo *shet-1* e suas subunidades separadamente em relação à desidratação, e mostrou que as frequências de *shet-1B* reduziram consideravelmente no grupo de crianças sem desidratação. A análise de contingência confirmou estatisticamente o potencial da subunidade *shet-1B* como um fator agravante para desidratação na shigelose e em contra partida, uma criança infectada com *Shigella* sem *shet-1B* (*shet-1B-*) tem uma característica da shigelose sem desidratação. Quando a presença do complexo *shet-1A+/shet1B+* foi avaliado, a tabela de contingência confirmou a influência como um fator agravante na desidratação, conforme esperado. Entretanto a presença de *shet-1A* e ausência de *shet1B* (*shet-1A+/shet-1B-*) não influenciaram como fator agravante na desidratação na shigelose. A subunidade *shet-1A* tem um papel secretório da subunidade *shet-1B*, que é reconhecidamente envolvida na ligação irreversível da toxina ao receptor do enterócito. Portanto, estes achados reforçam o papel do *shet-1B* como potente fator de virulência das *Shigellas*, podendo levar a complicações relacionadas à desidratação no quadro diarreico da shigelose.

Se a enterotoxina *shet-1* provoca desequilíbrio no transporte intestinal de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, por outro lado, a *shet-2* codificado no cromossomo de virulência está relacionada com a regulação da inflamação e processo febril (Fasano, et al., 1995, Nataro, et al., 1995). Quando o critério febre foi comparado, uma frequência maior *Shet-2+* em as crianças febris em relação a não febris foi verificada. Embora os nossos achados indiquem apenas uma suspeita, (mesmo não traduzida estatisticamente) eles estão corroborando com o que está estabelecido na literatura na qual a contribuição de *Shet-2* está relacionada na indução da inflamação nas células epiteliais durante a infecção por *Shigella* (Farfan et al. 2011).

Os dados epidemiológicos encontrados neste trabalho demonstram que as cepas circulantes no município de Manaus-AM são, em sua maioria, *S. flexneri*, seguido de *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*; e que estes dados estão de acordo com os relatos da literatura. É importante destacar o aparecimento de um isolado com resistência intermediária à ciprofloxacina e outro com resistência intermediária à ceftriaxona, que são os antibióticos atualmente recomendados e utilizados nos hospitais.

Os dados moleculares e de sintomatologia mostraram evidências sobre o potencial patogênico quase que exclusivos da subunidade *shet-1B* no processo de desidratação, e de *IpaH* na febre, na lesão do intestino evidenciado pelo diarreia sanguinolenta. Além destes, outros observados aqui tais como, *IpaBCD* (o mais freqüente e envolvido no processo febril e diarreico) e *shet-2* (também no processo febril), reunidos dariam informações para contribuir com pouca literatura que existe sobre isolados de *Shigella* selvagens oriundos de crianças com quadro diarreico com ou sem shigelose. Portanto, este estudo vem consolidar a importância de encontrar caminhos para bloquear a toxicidade ou modificações no fluido intestinal seja via vacinal ou por outras medidas de controle terapêutico, baseando-se nestes fatores de patogenicidade.

CONCLUSÕES

1. A *S. flexneri* foi a espécie mais frequente causadora de shigellose pediátrica seguida por *S. sonnei* e *S. boydii*. A *S. dysenteriae* teve baixa frequência.
2. Os sintomas da shigellose pediátrica foram diarreia (100%), febre (83%) vômito (58,3%), desidratação (63,8%) e diarreia sanguinolenta (61,1%).
3. A idade não influenciou como um fator de predisposição à diarreia nem aos sintomas vômito, desidratação, sangue visível ou oculto.
4. Embora estatisticamente não tenha sido significante, a frequência das crianças sem febre contendo *IpaH* e *Shet-2* tiveram redução sensível em relação a mesma frequência nas crianças com febre. Pois, são dois fatores de virulência relacionados na modulação da resposta imune ou na resposta inflamatória.
5. *Shet-1B*, reconhecidamente envolvida na ligação irreversível da toxina ao receptor do enterócito, funcionou como um fator agravante à desidratação na shigelose.
6. A frequência dos genes que codificam para as proteínas *IpaBCD* de *S. flexneri* foi muito grande, 75,0% sendo que cem por cento das crianças tiveram diarreia. Certamente, este conjunto de proteínas faz parte de uma maquinaria essencial para a patogenicidade da *Shigella*.
7. A análise confirmou que as crianças com diarreia sanguinolenta eram provocadas por *Shigella* carregando o fator de virulência *IpaH*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; SASAKAWA, C.; TOBE, T.; MAKINO, S.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M.. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 3:627–635, 1989.

ALANIO, A.; BERETTI, J.L.; DAUPHIN, B.; MELLADO, E.; QUESNE, G.; LACROIX, C.; AMARA, A.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; BOUGNOUX, M.E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, n. 5, p. 750 –755, 2011.

AL-HASANI K, NAVARRO-GARCIA F, HUERTA J, SAKELLARIS H, ADLER B. The Immunogenic SigA Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Binds to HEp-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *PLoS ONE*, vol. 4, n. 12, p. 8223, 2009.

ANDRADE, J.A.B.; OLIVEIRA, J.O.T.; FAGUNDES NETO, U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarreia aguda - fatores de risco associados ao óbito. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.45, n.2, p. 121-127, 1999.

ANGELINI, M.; STEHLING, E. G.; MORETTI, M. L.; SILVEIRA, W. D. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, vol.40, n.3, p. 685-692, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/medica/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf> acesso em: 20 de agosto 2011.

BANDO, S.; MORENO, A. C. R.; ALBUQUERQUE, J. A. T.; AMHAZ, J. M. K.; MOREIRA-FILHO, C. A.; MARTINEZ, M. B.. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online], vol.105, n.6, p. 786-791, 2010.

BASTOS, F. C.; LOUREIRO, E. C. B.. Antimicrobial Resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.44, n.5, p. 607-610, 2011.

BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, AND TURK M. Antibiotic susceptibility by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Patol*, vol. 45, n. 4, p. 493-496, 1996.

BEDFORD, L.; FONSEKA, S.; BOREN, T.; RANALLO, R.; SUVARNAPUNYA, A.; LEE, J.; BARNOY, S.; VENKATESAN, M.. Further characterization of *Shigella sonnei* live vaccine candidates WRS2 and WRS3-plasmid composition, invasion assays and Sereny reactions. *Gut Microbes* vol. 2, n. 4, p.244 – 251, 2011.

BELOIN C, DORMAN CJ: An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 47:825-838, 2003.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLIN, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*, vol. 6, n.1, p.e16424, 2011.

BENNISH, M. L.; KHAN, W. A.; BEGUM, M.; BRIDGES, E. A.; AHMED, A.; SAHA, D.; SALAM, M. A.; ACHESON, D.; RYAN, E. T.. Low risk of hemolytic uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for *Shigella dysenteriae* type 1 infection in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, n. 3, p. 356-362, 2006.

BIZZINI, A.; GREUB, G.. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, n. 11, p. 1614–1619, 2010.

BOURDET-SICARD, R.; EGILE, C.; SANSONETTI, P. J.; NHIEU, G. T. V.. Diversion of cytoskeletal processes by *Shigella* during invasion of epithelial cells. *Microbes and Infection*, vol. 2, n. 7, p. 813–819, 2000.

BRENNER, D. J.. Family I. Enterobacteriaceae. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md, 1984, p. 408–420.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). National Antimicrobial Resistance Monitoring System annual report. Atlanta, USA: CDC; 2009.

CERSINI, A.; MARTINO, M. C.; MARTINI, I.; ROSSI, G.; BERNARDINI, M. L.. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of *Shigella flexneri* Purine Biosynthesis Mutants. *Infect. Immun*, vol. 71, n. 12, p. 7002-7013, 2003.

CHAMEKH, M.; PHALIPON, A.; QUERTAINMONT, R.; SALMON, I.; SANSONETTI, P.; ALLAOUI, A.. Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *Journal of Immunology*, vol. 15, n. 180, p. 4292-4298, 2008.

CHIFIRIUC, M. C.; BLEOTU, C.; MĂRUȚESCU, L.; CRISTEA, D.; LAZĂR, V.. The modulation of hela cells secretory patterns by invasive *Shigella* spp. and enteroinvasive *E. coli* bacterial cells and their soluble components. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, vol. 69, n. 3, p. 139-144, 2010.

CHISTI, M.J.; FARUQUE, A.S.; KHAN, W.A.; DAS, S.K.; ZABED, M.B.; SALAM, M.A. Characteristics of children with *Shigella* encephalopathy: experience from a large urban diarrhea treatment center in Bangladesh. *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 29, n. 5, p. 444-447, 2010.

COSTER, T.S.; HOGE, C.W.; VANDEVERG, L.L.; HARTMAN, A.B.; OAKS, E.V.; VENKATESAN, M.M.; COHEN, D.; ROBIN, G.; FONTAINE-THOMPSON, A.; SANSONETTI, P.J.; HALE, TL. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infection and Immunity*, vol. 67, n. 7, p. 3437-3443, 1999.

CRISTEA, D.; CECIU, S.; CHITOIU, D.T.; BLEOTU, C.; LAZĂR, V.; CHIFIRIUC, M.C. Comparative study of pathogenicity tests for *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Roum Arch Microbiol Immunol*, vol. 68, n. 1, p. 44-49, 2009.

DINIZ-SANTOS, D.R.; SANTANA, J.S.; BARRETTO, J.R.; ANDRADE, M.G.M.; SILVA, L.R. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 9, n. 1, p. 77-83, 2005.

DORMAN, C. J.; PORTER, M.E. The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol.Microbiol.* 29:677–684., 1998.

DUPONT, H.L.; LEVINE, M.M.; HORNICK, R.B.; FORMAL, S.B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 159, n. 6, p. 1126-1128, 1989.

EHSANI, S.; SANTOS, J.C.; RODRIGUES, C.D.; HENRIQUES, R.; AUDRY, L.; ZIMMER, C.; SANSONETTI, P.; TRAN VAN NHIEU, G.; ENNINGA, J. Hierarchies of Host Factor Dynamics at the Entry Site of *Shigella flexneri* during Host Cell Invasion. *Infect. Immun.*, vol. 80, n. 7, p. 2548-2557, 2012.

FARFAN, M.J.; TORO, C.S.; BARRY, E.M.; NATARO, J.P.. *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61(3): 332–339, 2011.

FARUQUE, S.M.; KHAN, R.; KAMRUZZAMAN, M.; YAMASAKI, S.; AHMAD, Q.S.; AZIM, T.; NAIR, G.B.; TAKEDA, Y.; SACK, D.A. Isolation of *Shigella* dysenteriar type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, n. 8, p. 3908-3913, 2002.

FASANO, A.; NORIEGA, F.R.; MANEVAL, D.R. Jr.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSEL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M.M. *Shigella enterotoxin* 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *Journal Clinical Investigation* 95:2853–2861, 1995.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 73 (4) 1907-1916, 2005.

FOLSTER, J.P.; PECIC, G.; BOWEN, A.; RICKERT, R.; CARATTOLI, A.; WHICHARD, J.M. Decreased Susceptibility to Ciprofloxacin among *Shigella* Isolates in the United States, 2006 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, n. 4, p. 1758-1760, 2011.

FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic Analysis of Salmonella, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *Journal of clinical microbiology*, vol. 40, n. 8, p. 2779–2785, 2002.

GÓMEZ-DUARTE, O.G.; BAI, J.; NEWEL, E. Detection of *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by three-reaction multiplex PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 63, n. 1, p. 1-9, 2009.

GORDEN, J.; SMALL, P.L. Acid Resistance in Enteric Bacteria. *Infection And Immunity*, vol. 61, n. 1, p. 364-367, 1993.

GRECO, K.M.; MCDONOUGH, M.A.; BUTTERTON, J.R. Variation in the Shiga Toxin Region of 20th-Century Epidemic and Endemic *Shigella dysenteriae* 1 Strains. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 190, n. 2, p. 330-334, 2004.

GUERRANT, R.L.; KIRCHHOFF, L.V.; SHIELDS, D.S.; NATIONS, M.K.; LESLIE, J.; SOUSA, M.A.; ARAUJO, J.G.; CORREIA, L.L.; SAUER, K.T.; MCCLELLAND, K.E. Prospective Study of Diarrheal Illness in Northeastern Brazil: Patterns of Disease, Nutritional Impact, Etiologies and Risk Factors. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 148, n. 6, 986-997, 1983.

HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annual Review of Microbiology*, vol. 54, p. 641-679, 2000.

HALE, T. L. Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. *Microbiological Reviews*, vol. 55, n. 2, p. 206-224, 1991.

HEINDL, J.E.; SARAN, I.; YI, C.; LESSER, C.F.; GOLDBERG, M.B. Requirement for Formin-Induced Actin Polymerization during Spread of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun*, vol. 78, n. 1, 193-203, 2010.

HILBI, H.; MOSS, J.E.; HERSH, D.; CHEN, Y.; ARONDEL, J.; BANERJEE, S.; FLAVELL, R.A.; YUAN, J.; SANSONETTI, P.J.; ZYCHLINSKY, A. *Shigella*-induced Apoptosis Is Dependent on Caspase-1 Which Binds to *IpaB*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 4, n. 49, p. 32895-32900, 1998.

HUAN, P.T.; BASTIN, D.A.; WHITTLE, B.L.; LINDBERG, A.A.; VERMA, N.K. Molecular characterization of the genes involved in O-antigen modification, attachment, integration and excision in *Shigella flexneri* bacteriophage SfV. *Gene*, vol. 195, n. 2, p. 217-227, 1997.

ISLAM, D.; BANDHOLTZ, L.; NILSSON, J.; WIGZELL, H.; CHRISTENSSON, B.; AGERBERTH, B.; GUDMUNDSSON, G. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nature Medicine*, vol. 7, n. 2, p. 180-185, 2001.

JENNISON, A.V.; VERMA, N.K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *Microbiology Reviews*, vol. 28, n. 1, p. 43-58, 2004.

KANE, K.A.; DORMAN, C.J. VirB-Mediated Positive Feedback Control of the Virulence Gene Regulatory Cascade of *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology*, vol. 194, n. 19, p. 5264-5273, 2012.

KATO, J.-I.; ITO, K.-I.; NAKAMURA, A.; WATANABE, H. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LLC-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: virF is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect. Immun.* 57:1391–1398, 1989.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5a ed., Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1465, 2001.

KOTERSKI, J. F., NAHVI, M., VENKATESAN, M.M.; HAIMOVICH, B. Virulent *Shigella flexneri* Causes Damage to Mitochondria and Triggers Necrosis in Infected Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infection and Immunity*, vol. 73, n. 1, p. 504-513, 2005.

KOTLOFF, K. L., WINICKOFF, J. P.; IVANOFF, ; CLEMENS, J. D. ; SWERDLOW, D. L.; SANSONETTI, P. J.; ADAK, G. K. ; LEVINE, M. M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.

KRUMMENAUER, E.C.; CARNEIRO, M.; MACHADO, J.A.A.; RAUBER, J.N.; ADAM, M.S.; MULLER, L.B.; PERSCH, M.S.; SOUZA, J.G. The impact of an antimicrobial resistance and the challenge for professionals. *AJIC: American Journal of Infection Control* - 11 October 2012 (10.1016/j.ajic.2012.03.036)

LAY JO, JR. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev*, vol. 20, n. 2, p. 172–194, 2001.

LEAL, N.M.; CAVALCANTI, T.I.R.; PRAZERES, D.; HOFER, E. Enteropatógenos detectados em crianças sadias em três comunidades de baixa renda, em Recife, Estado de Pernambuco, Brasil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 3, n. 2, p. 153-159, 1998.

LEVINE, M. M., KOTLOFF, K.L.; BARRY, E.M.; PASETTI, M.F.; SZTEIN, M.B. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, p. 540-553, 2007.

LINHARES, A.C. Epidemiologia das Infecções Diarréicas entre Populações Indígenas da Amazônia. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 8, n. 2, p. 121-128, 1992.

LINHARES AC, MONÇÃO HC, GABBAY YB, ARAÚJO VLC, SERRUYA AC, LOUREIRO ECB. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, n. 3, p. 384-390, 1983.

SANDRIN, T.R.; GOLDSTEIN, J.E.; SCHUMAKER, S. Maldi tof ms profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* 2012 Sep 19. doi: 10.1002/mas.21359.

MARTEYN, B., WEST, N.P.; BROWNING, D.F.; COLE, J.A.; SHAW, J.G.; PALM, F.; MOUNIER, J.; PRÉVOST, M.C.; SANSONETTI, P.; TANG, C.M. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*, vol. 465, p. 355-360, 2010.

MARTINEZ-BECERRA, F.J.; KISSMANN, J.M.; DIAZ-MCNAIR, J.; CHOUDHARI, S.P.; QUICK, A.M.; MELLADO-SANCHEZ, G.; CLEMENTS, J.D.; PASETTI, M.F.; PICKING, W.L. Broadly Protective *Shigella* Vaccine Based on Type III Secretion Apparatus Proteins. *Infect. Immun*, vol. 80, n. 3, p. 1222-1231, 2012.

MENSA, L., MARCO, F.; VILA, J.; GASCON, J.; RUIZ, J. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, n. 3, p. 279–281, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde: Promovendo o Aleitamento Materno 2ª edição, revisada. Brasília: Álbum seriado, 18p., 2007.

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.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of Childhood Diarrhea in the Northeast of Brazil: Significant Emergent Diarrheal Pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 66, p. 50-57, 2010.

MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M.A. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 73, n. 10, p. 3380-3390, 2007.

NATARO JP, SERIWATANA J, FASANO A, MANEVAL DR, GUERS LD, NORIEGA F, DUBOVSKY F, LEVINE MM, MORRIS JG JR. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* 63:4721–4728, 1995.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. *The Journal of Microbiology*, vol. 42, n. 2, p. 133-143, 2005.

NONAKA, T.; KUWABARA, T.; MIMURO, H.; KUWAE, A.; IMAJOH-OHMI. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology* 149 2513-2527, 2003.

NUNES, M.R.; MAGALHÃES, P.P.; PENNA, F.J.; NUNES, J.M.; MENDES, E.N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J Pediatr (Rio J)*, vol. 88, n. 2, 125-128, 2012.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H.P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

ORLANDI, P. P., SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; CUNHA, R.P.A.; DURLACHER, R.; SILVA, L.H.P. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 96, n. 5, p. 621-625, 2001.

PEIRANO, G., SOUZA, F.D.S.; RODRIGUES, D.D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.

PENATTI, M.P.; HOLLANDA, L.M.; NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; LANCELLOTTI, M.; ANGELLINI, M.; BROCCHI, M.; ROCHA, M.M.; DIAS DA SILVEIRA, W. 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* [online], vol.40, n.2, p. 249-258, 2007.

PU, X.Y.; PAN, J.C.; WANG, H.Q.; ZHANG, W.; HUANG, Z.C.; GU, Y.M. Characterization of fluoroquinolone-resistant *Shigella flexneri* in Hangzhou area of China. *J. Antimicrob. Chemother.* Vol. 63, n. 5, p. 917–920, 2009.

SANDRIN, T.R.; GOLDSTEIN, J.E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* 2012 Sep 19. doi: 10.1002/mas.21359.

SANSONETTI, P.J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A.T.; MOUNIER, J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa Cells: Lysis of the Phagocytic Vacuole and Plasmid-Mediated Contact Hemolysis. *Infection and immunity*, vol. 51, n. 2, p. 461-469, 1986.

SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 25, n. 1, p. 3-14, 2001.

SANSONETTI, P. J. War and Peace at Mucosal Surfaces. *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, p. 953-964, 2004.

SANSONETTI, P. J.; EGILE, C. Molecular bases of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 74, p. 191-197, 1998.

SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. M Cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Seminars in Immunology*, vol. 11, n. 3, p. 193-203, 1999.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, n. 1, p. 14-56, 2004.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.

SERGIO, J. V.; LEON, A.C.P. Analysis of mortality from diarrheic diseases in under-five children in Brazilian cities with more than 150.000 inhabitants. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 25, n. 5, p. 1093-1102, 2009.

SHEN, D. K.; SAURYA, S.; WAGNER, C.; NISHIOKA, H.; BLOCKER, A.J. Domains of the *Shigella flexneri* Type III Secretion System IpaB Protein Involved in Secretion. *Infection and immunity*, vol. 78, n. 12, p. 4999-5010, 2010.

SILVA, T.; NOGUEIRA, P.A.; MAGALHÃES, G.F.; GRAVA, A.F.; SILVA, L.H.P.; ORLANDI, P.P. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 103, n. 7, p. 731-733, 2008.

SOUZA, E.C., MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal De Pediatria*, vol. 77, n. 1, p. 31-38, 2002.

TALUKDER, K.A., MONDOL, A.S.; ISLAM, M.A.; ISLAM, Z.; DUTTA, D.K.; KHAJANCHI, B.K.; AZMI, I.J.; HOSSAIN, M.A.; RAHMAN, M.; CHEASTY, T.; CRAVIOTO, A.; NAIR, G.B.; SACK, D.A. A novel serovar of *Shigella dysenteriae* from patients with diarrhoea in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, n. 5, p. 654-658, 2007.

TORRES, A.G. Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 46, n3-4, p. 89-97, 2004.

TROFA, A.F.; UENO-OLSEN, H.; OIWA, R.; YOSHIKAWA, M. Dr. Kyoshi Shiga: Discoverer of the Syntery Bacillus. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 29, n. 5, p. 1303-1306, 1999.

VAN DEN BELD, M.J.C.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiol Infect Dis.*, vol. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

WALTERS, L.L.; RATERMAN, E.L.; GRYS, T.E.; WELCH, R.A. Atypical *Shigella boydii* 13 encodes virulence factors seen in attaching and effacing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 328, n. 1, p. 20-25, 2012.

WANG, L.T.; LEE, F.L.; TAI, C.J.; KASAI, H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*. Vol. 57, n. 8, 1846-1850, 2007.

WANG, X.P.; ZHU, D.K.; WANG, M.S.; CHENG, A.C.; JIA, R.Y.; CHEN, S.; CHEN, X.Y.; TANG, T. Development and application of specific polymerase chain reaction

assay targeting the *gyrB* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*. *Poult Sci.* Vol. 91, n. 10, p. 2450-2453, 2012.

WEST, N. P., SANSONETTI, P.; MOUNIER, J.; EXLEY, R.M.; PARSOT, C.; GUADAGNINI, S.; PRÉVOST, M.C.; PROCHNICKA-CHALUFOUR, A.; DELEPIERRE, M.; TANGUY, M.; TANG, C.M. Optimization of Virulence Functions Through Glucosylation of *Shigella* LPS. *Science*, vol. 307, n. 5713, p. 1313-1317, 2005.

WIWANITKIT, V. Sexuality Transmitted Shigellosis. *Sexuality and Disability*, vol. 24, n. 1, p. 69-71, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. 2005, disponível em: <<http://www.who.int/topics/cholera/publications/shigellosis/en/index.html>> acessado em: 22 de novembro de 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal Diseases, Initiative for Vaccine Research. 2009, disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html>, acessado em 10 de março de 2012.

WU, T.; GRASSEL, C.; LEVINE, M.M.; BARRY, E.M. Live Attenuated *Shigella dysenteriae* Type 1 Vaccine Strains Overexpressing Shiga Toxin B Subunit. *Infect Immun.* vol. 79, n. 12, p. 4912-22, 2011.

XIA, S.; XU, B.; HUANG, L.; ZHAO, J.Y.; RAN, L.; ZHANG, J.; CHEN, H.; PULSRIKARN, C.; PORNRUANGWONG, S.; AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R.S. Prevalence and Characterization of Human *Shigella* Infections in Henan Province, China, in 2006. *J Clin Microbiol.* vol. 49, n. 1, p. 232-42, 2011.

YE, C.; LAN, R.; XIA, S.; ZHANG, J.; SUN, Q.; ZHANG, S.; JING, H.; WANG, L.; LI, Z.; ZHOU, Z.; ZHAO, A.; CUI, Z.; CAO, J.; JIN, D.; HUANG, L.; WANG, Y.; LUO, X.; BAI, X.; WANG, Y.; WANG, P.; XU, Q.; XU, J. Emergence of a New Multidrug-Resistant Serotype X Variant in an Epidemic Clone of *Shigella flexneri*. *J Clin Microbiol.* Vol. 48, n. 2, p. 419-426, 2010.

ZHANG, X.; MCDANIEL, A.D.; WOLF, L.E.; KEUSCH, G.T.; WALDOR, M.K.; ACHESON, D.W. Quinolone antibiotics induce shiga toxin-encoding bacteriophages toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 2, n. 181, p. 664-670, 2000.

ZYCHLINSKY, A.; THIRUMALAI, K.; ARONDEL, J.; CANTEY, J.R.; ALIPRANTIS, A.O.; SANSONETTI, P.J. In Vivo Apoptosis in *Shigella flexneri* Infections. *Infection And Immunity*, vol. 64, n. 12, p. 5357-5365, 1996.

ZYCHLINSKY, A., SANSONETTI, P. J. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? . *Trends in Microbiology*, vol. 5, n. 5, p. 201-204, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE I

DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

PARA PUBLICAÇÕES POSTERIORES

Dos 36 casos de infecção por *Shigella* encontrados em uma coleta de 1.500 amostras, foi observado que 47,22% (17/36) destes casos ocorreram na Zona Leste de Manaus, 41,66% (15/36) ocorreram na Zona Sul e 11,11% (4/36) na Zona Oeste. O aparecimento de enterites como a shigellose é reflexo da falta de saneamento básico no Município, portanto, todas as crianças participantes do estudo habitavam em área desprovida de saneamento e contavam com este fator de risco facilitador.

Entre as crianças infectadas, 61,11% (22/36) são do sexo masculino e 38,88% do sexo feminino, sendo que dentre elas, 22% (8/36) já haviam apresentado mais de um quadro diarreico no ano. As infecções recorrentes são um grave problema, pois causam um déficit no estado nutricional da criança, e caso esta já tenha histórico de desnutrição, este quadro se agrava ainda mais, tornando a criança mais vulnerável a contrair outras infecções, gerando um ciclo vicioso de nutrição prejudicada, infecções recorrentes e posteriormente, retardo no crescimento (Nyigi, 2005).

Com relação à fonte de água utilizada para consumo familiar, 50% (18/36) dos casos utilizavam água de poço para consumo; 19,44% (7/36) utilizavam água filtrada, 16,66% (6/36) utilizavam água mineral, 11,11% (4/36) utilizavam água encanada e 2,77% (1/36) utilizavam a água do rio. Entre estes, nenhum relatou tratamento prévio da água para consumo com hipoclorito ou fervura. Com relação à higiene com os alimentos consumidos, 50% (18/36) relataram que sempre o fazem, 36% (13/36) relataram que é feito habitualmente, 11,11% (4/36) apenas às vezes e 2,77% (1/36) desconhece.

Sabendo que a forma predominante de infecção é fecal-oral, comumente relacionada à comida contaminada, água ou fômites (Nyigi, 2005), é de extrema importância que as recomendações para prevenção da shigellose outras doenças

diarreicas (WHO, 2005) sejam seguidas com rigor. Ou seja, utilizar sempre água filtrada ou clorada, higienizar mãos e alimentos e realizar também o controle de moscas.

16% (6/36) dos acompanhantes das crianças relataram contaminação parental, fato que também é reflexo dos fatores citados anteriormente (falta de saneamento básico e descuido nos hábitos de prevenção de doenças). Há aqui um importante fator a ser considerado. Aparentemente, poucos foram os casos que relataram contaminação parental, porém, quando há variáveis de risco, deve-se considerar que outras pessoas que moram na mesma casa podem ser portadores assintomáticos – e estes tem um importante papel na manutenção e propagação de agentes causadores de problemas entéricos (Leal et al, 1988).

Tabela 2 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. (In) início da diarreia, (Dur) duração da diarreia, (Ep) número de episódios por ano, (CoPar) contaminação parental, (Am) tempo de amamentação em meses.

Código	Hospital	Meses	Sexo	Bairro	Data	In.	Dur.	Ep.	CoPar.	Am.
0002	FIOSUL	21	F	PETRÓPOLIS	31/07/2007	24/07/2007	7	0	0	16
0004	FIOSUL	37	F	SANTA ETELVINA	02/08/2007	31/07/2007	2	0	0	24
0036	FIOLESTE	24	F	ZUMBI I	23/08/2007	22/08/2007	1	0	0	22
0039	FIOLESTE	23	M	JOÃO PAULO II	27/08/2007	27/08/2007	1	3	0	23
0053	FIOSUL	08	M	JAPIIM II	11/09/2007	08/09/2007	3	0	0	1
0080	FIOLESTE	50	M	RAMAL ACARAL	19/09/2007	17/09/2007	3	4	0	48
0085	FIOLESTE	97	M	SÃO JOSÉ II	24/09/2007	24/09/2007	1	0	0	24
0097	FIOLESTE	10	M	SÃO JOSÉ III	25/09/2007	12/09/2007	13	0	0	10
0113	FIOLESTE	07	M	GILBERTO MASTRIN	02/10/2007	01/10/2007	1	0	0	7
0183	FIOSUL	109	F	SÃO LAZARO	25/10/2007	24/10/2007	2	0	0	0
0188	FIOLESTE	33	M	GRANDE VITÓRIA	29/10/2007	19/10/2007	10	0	0	12
0190	FIOLESTE	74	F	ARMANDO MENDES	29/10/2007	27/10/2007	3	2	1	6
0192	FIOLESTE	113	M	MONTE SIÃO	29/10/2007	24/10/2007	5	0	1	48
0199	FIOLESTE	35	M	RIACHO DOCE I	30/10/2007	30/10/2007	1	0	0	12
0201	FIOLESTE	03	M	JORGE TEXEIRA II	30/10/2007	27/10/2007	3	0	0	3
0202	FIOSUL	17	M	RAIZ	30/10/2007	24/10/2007	6	0	0	17
0279	FIOSUL	30	M	PETROPOLIS	10/12/2007	07/12/2007	3	0	0	6
0337	FIOSUL	15	F	JAPIIM	22/01/2008	22/01/2008	1	1	1	0
0539	FIOLESTE	12	M	JOÃO PAULO II	31/03/2008	16/03/2008	15	0	1	12
0545	FIOESTE	05	M	23 DE SETEMBRO	31/03/2008	29/03/2008	2	1	0	5
0562	FIOLESTE	36	M	CIDADE NOVA	01/04/2008	31/03/2008	1	2	0	36
0586	FIOSUL	96	F	PETROPOLIS	07/04/2008	05/04/2008	2	0	0	12
0625	FIOSUL	19	F	JAPIIM I	16/04/2008	15/04/2008	1	2	0	19
0726	FIOESTE	21	F	COMPENSA III	08/05/2008	05/05/2008	3	0	0	8
0837	FIOSUL	08	M	BAIRRO DA UNIÃO	26/05/2008	20/05/2008	6	0	0	8
0873	FIOSUL	05	M	NOVO ISRAEL I	02/06/2008	14/05/2008	20	0	0	5
0883	FIOLESTE	19	F	JOÃO BOSCO	03/06/2008	01/06/2008	3	0	0	1
0893	FIOESTE	18	F	COM. ISMAIL AZIS	03/06/2008	01/06/2008	3	1	0	9
0956	FIOSUL	48	F	RAIZ	15/07/2008	15/07/2008	0	1	0	0
1039	FIOLESTE	34	F	ARMANDO MENDES	29/07/2008	26/07/2008	3	2	0	18
1065	FIOSUL	47	M	MAUAZINHO	06/08/2008	06/08/2008	0	0	0	47
1118	FIOLESTE	24	M	JOÃO PAULO II	28/08/2008	27/08/2008	1	3	1	19
1124	FIOSUL	48	M	SANTO ANTONIO	02/09/2008	01/09/2008	1	0	1	36
1163	FIOLESTE	47	M	COROADO	18/09/2008	15/09/2008	3	3	0	4
1234	FIOSUL	56	M	PETROPOLIS	14/10/2008	13/10/2008	1	0	0	24
1257	FIOESTE	03	F	REDENÇÃO	21/10/2008	19/10/2008	2	0	0	3

Tabela 3 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. (AgCon) água para consumo, (Hip) tratamento com hipoclorito, (Ferv) tratamento por fervura, (HigAl) frequência de higiene com alimentos, (PSO) sangue oculto nas fezes.

Código	AgCon.	Hip.	Ferv.	HigAl.	Febre	Vômito	Desid.	Sangue visível	PSO
0002	ENCANADA	0	0	HAB.	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO
0004	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
0036	MINERAL	0	0	AS VEZES	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM
0039	ENCANADA	0	0	SEMPRE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
0053	POÇO	0	0	AS VEZES	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
0080	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM
0085	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM
0097	FILTRADA	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
0113	RIO	0	0	SEMPRE	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM
0183	FILTRADA	0	0	HAB.	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
0188	FILTRADA	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
0190	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
0192	FILTRADA	0	0	HAB.	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
0199	POÇO	0	0	DESCONHECE	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM
0201	POÇO	0	0	AS VEZES	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
0202	MINERAL	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
0279	FILTRADA	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
0337	POÇO	0	0	HAB.	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
0539	ENCANADA	0	0	AS VEZES	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO
0545	POÇO	0	0	HAB.	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM
0562	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
0586	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM
0625	POÇO	0	0	HAB.	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM
0726	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
0837	FILTRADA	0	0	HAB.	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
0873	MINERAL	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM
0883	MINERAL	0	0	HAB.	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
0893	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
0956	ENCANADA	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
1039	FILTRADA	0	0	HAB.	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
1065	POÇO	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
1118	POÇO	0	0	HAB.	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
1124	MINERAL	0	0	SEMPRE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
1163	POÇO	0	0	HAB.	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM
1234	POÇO	0	0	HAB.	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
1257	MINERAL	0	0	HAB.	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO

APÊNDICE II

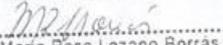
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 266/2006, intitulado: “Caracterização fenotípica e genotípica dos enteropatógenos isolados de crianças de 0-10 anos de idade, com diarreia aguda e de repetição na região de Manaus-Amazonas”. Tendo como Pesquisadora Responsável Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


.....
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

APÊNDICE III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título do Projeto: **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DE CRIANÇAS DE 0-10 ANOS DE IDADE, COM DIARRÉIA AGUDA E DE REPETIÇÃO NA CIDADE DE MANAUS - AMAZONAS.**

Você está sendo convidado para participar de um protocolo de pesquisa clínica e laboratorial, a ser realizado sob a responsabilidade da FIOCRUZ-MANAUS. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

2. DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVOS

A diarreia infantil é um dos maiores problemas de saúde pública do nosso país. Nosso objetivo é conhecer quais são as bactérias, vírus, e parasitas mais frequentes nas crianças atendidas nesta unidade hospitalar pediátrica pública da cidade de Manaus.

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS:

Para a realização deste estudo serão realizados os procedimentos para coleta de fezes, através de fraldas e coletores estéreis, por evacuação espontânea ou induzidas com supositório de glicerina.

4. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

O desconforto para a criança será proveniente da introdução do supositório de glicerina, quando necessário.

5. BENEFÍCIO PARA O PACIENTE:

Este estudo traz vários benefícios direto para a criança, através dele, os médicos terão conhecimento do agente causador da diarreia, podendo direcionar o tratamento adequado para que a criança não precise ficar muito tempo no hospital, assim como não precise tomar medicamentos desnecessários.

6. GARANTIA DE ACESSO AOS REGISTROS MÉDICOS:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais da pesquisa para esclarecimento das eventuais dúvidas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética e pesquisa (CEP) na Universidade Federal do Amazonas CEP/UFAM.

7. GARANTIA DA LIBERDADE DA RETIRADA DO CONSENTIMENTO:

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento hospitalar.

8. O DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE:

As informações coletadas durante o estudo serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. As pessoas autorizadas dos órgãos governamentais terão acesso aos resultados, para verificar se o estudo foi devidamente realizado. Isto só pode ser feito com a sua permissão, e é, portanto entendido que pela assinatura do formulário de consentimento informado, você estará concedendo sua permissão.

9. DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS:

Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa, quando estes resultados forem de conhecimento dos médicos e dos pesquisadores.

10. COMPROMISSO DO PESQUISADOR DE UTILIZAR OS DADOS E O MATERIAL COLETADO PARA ESTA PESQUISA:

O pesquisador compromete-se em utilizar os dados e o material coletado somente na pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____

Responsável pelo menor, _____ aceito participar do projeto de pesquisa “CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DE CRIANÇAS DE 0-10 ANOS DE IDADE, COM DIARRÉIA AGUDA E DE REPETIÇÃO NA CIDADE DE MANAUS - AMAZONAS.”, tendo sido informado da justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa e da liberdade de recusar a participar ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao nosso cuidado.

Manaus, _____ de 2.007.

RESPONSÁVEL: -

Assinatura



Digital

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARRÉICA (CASO)

Definição de caso: Crianças com diarreia (maior ou igual a três evacuações de fezes não formadas ou aquosas/dia), por até sete dias.

A) Informações Demográficas

Código _____ n° _____

Nome _____

Idade (no começo da diarreia) _____ data de nascimento ____/____/____

Endereço: _____

Código: _____

B) Informações clínicas

Data desta visita: ____/____/____ data do início da diarreia: ____/____/____

duração da diarreia _____ (dias). Quantos episódios de diarreia teve no último ano:

Presença de sinais clínicos

Sintomas sim () não () desconhece ()

Febre sim () não () desconhece ()

Vômito sim () não () desconhece ()

Desidratação sim () não () desconhece ()

Presença de sangue nas fezes sim () não () desconhece ()

C) Informações Epidemiológicas

1. O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?

Sim () Não () Desconhece ()

2. Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes do início deste caso de diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

3. A criança foi amamentada por quanto tempo? _____

4. a. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

b. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

c. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

5. A criança está tomando algum antibiótico para essa diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

Se sim:

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Qual o nome do antibiótico: _____

Informações Laboratoriais

Data de obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada: fezes () swab ()

Foram isoladas amostras de algum patógeno? Sim () Não ()

Se sim: especifique: _____

Presença de Rotavírus: sim () não ()

Presença de outro vírus entérico: sim () não ()

Número de *E. coli* isoladas: _____

Presença de sangue: : sim () não ()

APÊNDICE IV**ARTIGO DE REVISÃO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA
SCIENTIA AMAZONIA**

***Shigella* sp e patogênese: uma revisão.**

APÊNDICE V**ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA MEMÓRIAS DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ****FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS À SHIGELLOSE PEDIÁTRICA**

Virulence factors associated shigellosis pediatric

Pediatric shigellosis in Manaus/AM 2007 to 2009

Autores: Maria Carolina Scheffer de Souza*, Carolinie Batista Nobre da Cruz, Paula Taquita Serra, Ivanildes Santos, Paulo Afonso Nogueira, Patrícia Puccinelli Orlandi.

* Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia. Rua Terezina, 476. Adrianópolis. Manaus - AM. CEP: 69.057-070. Tel.: +55 (92) 3621-2323.

patricia_orlandi@amazonia.fiocruz.br

Resumo

A shigelose é uma doença manifestada desde uma diarreia leve até uma severa disenteria. A habilidade de invadir células e provocar lesão na mucosa intestinal, bem como levar desequilíbrio na homeostase e modular a resposta inflamatória a nível intestinal tem sido atribuídos a diversos fatores de patogenicidade das *Shigella* spp. Neste trabalho, trinta e seis isolados de *Shigella* foram identificados a partir de um estudo etiológico de diarreia infantil em 1.500 crianças com idade entre 0-10 anos que deram entrada nos hospitais de Manaus (Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste) com quadro diarreico, no período entre agosto de 2007 a julho de 2009. *Shigella flexneri* foi a espécie mais frequente (65%), seguida por *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12,5%) e *S. dysenteriae* (2,5%). Entre os isolados, merece destaque o aparecimento de um isolado resistente (intermediária) à ciprofloxacina e 1 resistente (intermediária) à ceftriaxona, que são os antibióticos recomendados pela WHO. A tipagem molecular dos fatores de patogenicidade mostrou evidências sobre o potencial patogênico da subunidade *shet-1B* das *Shigellas*, podendo levar a complicações relacionadas à desidratação, de *IpaH* na febre e na lesão do intestino evidenciado pelo diarreia sanguinolenta. *IpaBCD* foram os fatores de virulência mais predominantes seguido de *IpaH*. E uma frequência maior de *Shet-2+* em as crianças febris em relação a não febris foi verificada. Este estudo vem contribuir com a pouca literatura que existe a relação de fatores de patogenicidade de isolados de *Shigella* selvagens com quadro diarreico com ou sem shigelose e consolidar a importância de encontrar caminhos para bloquear a toxicidade destes principais fatores de patogenicidade.

Palavras-chave: *Shigella*, shigellose, genes de virulência, sintomatologia.

ABSTRACT

Shigellosis is a disease manifested from mild diarrhea to severe dysentery. The ability to invade cells, cause injury and imbalance in the homeostasis to the intestinal mucosa and modulate the inflammatory response has been attributed to several factors of pathogenicity of *Shigella spp.* In this study, thirty-six isolates of *Shigella* were identified from an etiologic study of childhood diarrhea in 1,500 children aged 0-10 years who were admitted to hospitals in Manaus (East-South-and-West Zones) with in the period between August 2007 and July 2009. *Shigella flexneri* was the most common (65%), followed by *Shigella sonnei* (20%), *Shigella boydii* (12.5%) and *Shigella dysenteriae* (2.5%). Among the isolates, protrudes the emergence of a resistant isolate (intermediate) resistant to ciprofloxacin and 1 (intermediate) to ceftriaxone, which are antibiotics recommended by WHO. Molecular typing of the pathogenicity factors showed evidence of the pathogenic potential of *shet-1B* subunit of *Shigellas* and can lead to complications related to dehydration. Frequencies of the *IpaBCD* (the most prevalent factors among isolates) followed by *IpaH* suspect associations to fever and bowel injury. The *IpaH* was clearly associated to bloody diarrhea. And finally, differences in the frequencies of *Shet-2* positives between febrile-based groups reinforce its role in the inflammatory response. This study has contributed to the few data in the literature on the pathogenicity of wild *Shigella* isolates associated to shigellosis and consolidate the importance of finding ways to block the toxicity of these major pathogenicity factors.

Patrocínio: CPqLMD - Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ,
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Introdução:

Bacilos gram-negativos da família Enterobacteriaceae, as *Shigella* são enteropatógenos perfeitamente habilitados em colonizar o intestino do hospedeiro, utilizando inclusive as defesas do hospedeiro ao seu favor (Niyogi, 2005; Martinez-Becerra et al, 2012; Shroeder & Hilbi, 2008; Kane & Dorman, 2012). O gênero *Shigella* compreende quatro subgrupos que historicamente tratadas como espécies *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae* (citado em Grimont et al. 2007). Elas são responsáveis pela shigellose, doença que pode causar desde uma leve diarreia até uma disenteria muco-sanguinolenta acompanhada febre, náuseas, vômitos e desidratação. A shigelose pode evoluir para um quadro severo quando os sintomas são acompanhados de tenesmo retal com aparecimento de sintomas neurológicos tais como cefaleia e letargia dependendo do potencial de virulência da cepa e também do estado nutricional do indivíduo (Angelini et al, 2009; Coster et al, 1999).

O genoma bacteriano apresenta sequências denominadas ilhas de patogenicidade (IPAs), primeiramente descritas como regiões do DNA cromossômico, mas também plasmídeos ou bacteriófagos, que se diferenciam do resto do genoma, pois carregam genes que codificam para um ou mais fatores de virulência e foram adquiridas por transferência horizontal de genes (Hacker e Kaper 2000).

Genes responsáveis por importantes fatores de patogenicidade da bactéria no trato intestinal, tais como enterotoxinas Shiga toxina (*Stx*) e a enterotoxina 1 (*Shet1*) estão contidos no cromossomo de *Shigella* (Sansone, 2001; Niyogi, 2005). Os

isolados virulentos de *Shigella* carregam um plasmídio de 220kb que codifica o “fenótipo invasivo” para estas espécies caracterizada por uma maquinaria de secreção de proteína Ipa tipos 3 (SST-3), que compreende dentre outras as proteínas Ipa B, IpaC e IpaD.

Na literatura os trabalhos envolvendo fatores de patogenicidade são baseados em modelos experimentais de infecção, geralmente coelhos, utilizando amostras de *Shigellas* padrão e tudo que se conhece sobre o papel dos fatores de patogenicidade são baseados nestes modelos. Os poucos trabalhos realizados com isolados de *Shigella* selvagens na realidade são puramente epidemiológicos e analisam prevalências de fatores de patogenicidade geralmente com o intuito de buscar a identificação e a diferenciação de espécies de *Shigellas*, ou em alguns interesses de ensaios vacinais.

São poucos os trabalhos que mostraram ou tentaram mostrar alguma associação entre fatores de patogenicidade, sintomatologia da shigelose pediátrica e isolados selvagens. Neste trabalho trinta e seis isolados *Shigella* oriundos de uma pesquisa sobre a etiologia da diarreia infantil em crianças menores de 10 anos residentes da Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste da cidade no período de agosto de 2007 a julho de 2009 na qual 1500 crianças participaram na qual *Shigella* foi a 4ª causa de diarreia. O presente trabalho traz uma enorme contribuição à literatura sobre a toxicidade dos principais fatores de patogenicidade associados à sintomatologia da shigelose.

Materiais e Métodos:

Foram utilizadas 36 isolados de *Shigella* previamente identificadas no estudo etiológico realizado nos hospitais de Manaus (Zona Leste, Zona Sul e Zona Oeste) entre agosto de 2007 a julho de 2009, na qual 1.500 crianças com idade entre 0-10 anos apresentavam diarreia. O acompanhante responsável pela criança foi primeiramente

esclarecido a respeito da pesquisa e convidado a colaborar preenchendo o Termo de Consentimento e a Ficha de Dados Clínicos (Comitê de Ética UFAM 266/206).

Foi considerada como febre a temperatura axilar acima de 37,8°C, quando verificada no momento da avaliação clínica ou quando referida pela mãe. A desidratação foi diagnosticada pelo profissional médico responsável. A presença ou ausência de vômito foi relatada pelo responsável pela avaliação clínica. A presença de sangue nas fezes foi determinada após a passagem pelo Kit Fecacoult para sangue oculto nas fezes (Inlab diagnóstica).

As amostras foram aliquotadas em placas nos meios: Agar MacConckey, Agar SS, Agar VB, Agar XLD; e identificadas em galeria bioquímica de: citrato, EPM e Mili. A sorologia foi realizada através da técnica de aglutinação em lâminas com soros procedentes da PROMICRO: *S. sonnei* 1 e 2, *S. flexneri* polivalente, *S. dysenteriae* 2 e *S. boydii* 11.

A técnica utilizada para o antibiograma foi descrita por Bauer et al (1996). Os antibióticos testados foram: AMC - amicacina + ácido clavulânico, AMP - ampicilina, CIP - ciprofloxacina, CLO - cloranfenicol, CRO - ceftriaxona, GEN - gentamicina, K - kanamicina, NAL - ácido nalidíxico, TET - tetraciclina.

Para a pesquisa de genes de virulência, o DNA das amostras foi extraído através da técnica fenol-clorofórmio. Foram utilizados 8 primers relacionados ao gênero *Shigella* e dois primers (*uidA* e *invE*) associados à invasão e encontrados também em *E.coli*.

EVT 5` CAACACTGGATGATCTCAG 3'
 5` CCCCTCAACTGCTAATA 3' (Faruque, et al. 2002)
 Ial 5` CTGGATGGTATGGTGAGG 3`
 5` GGAGGCCAACAATTATTTCC3` (Talukder, Mondol et al. 2007)
 IpaBCD 5` GCTATAGCAGTGACATGGCTATAGCAGTG 3`
 5` ACGAGTTCGAAGCACTC 3` (Faruque, Khan et al. 2002)
 IpaH 5` CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG 3`
 5` GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC 3` (Gómez-Duarte, et al. 2009)

Shet1A 5` TCACGCTACCATCAAAGA 3`
 5` TATCCCCCTTTGGTGGTA 3` (Talukder, Mondol et al. 2007)
 Shet1B 5` GTGAACCTGCTGCCGATATC 3`
 5` ATTAGTGGATAAAAATGACG 3` (Talukder, et al. 2007)
 Shet2 5` ATGTGCCTGCTATTATTTAT 3`
 5` CATAATAATAAGCGGTCAGC 3` (Talukder, et al. 2007)
 VirF 5` TCAGGCAATGAAACTTTGAC 3`
 5` TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC 3` (Gómez-Duarte, et al. 2009)
 uidA 5` ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC 3`
 5` AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG 3` (Müller et al, 2007)
 invE 5` CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG 3`
 5` CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC 3` (Müller et al, 2007)
 As reações foram realizadas nas seguintes condições: 40ng de DNA, tampão 5X,

0,25mM de dNTPs, 2.5mM de MgCl₂, 5mM de cada primer, 2,5U de Taq DNA polimerase “High-fidelity” (Invitrogen) e água deionizada esterilizada para um volume total de 12,5µl. O programa de PCR utilizado em termociclador (Eppendorf) era composto pelos seguintes passos: 94°C por 3 minutos, seguida de ciclo de 30 vezes composto de um passo de 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura variável para cada gene por 45 segundos e um passo de 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O passo de extensão final das fitas foi a 72°C durante 10 minutos, seguido do resfriamento a 4°C. A temperatura de anelamento foi de 59°C para os genes IpaBCD e IpaH, 56°C para invE e EVT, 57°C para Shet1A, Shet1B, 52°C para Shet2 e ial, 60°C para virF e 54°C para uidA. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em cubas horizontais, a 100V, em tampão TBE. O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado em transiluminador.

RESULTADOS

Os testes bioquímicos e sorológicos realizados demonstraram que *S. flexneri* foi a mais freqüente (65%), seguida por *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12,5%) e *S. dysenteriae* (2,5%). Foi observado que 100% dos isolados (36/36) se mostraram sensíveis à canamicina e ao ácido nalidíxico. Poucos isolados apresentaram resistência intermediária aos agentes, sendo 8.33% (3/36) à amicacina + ácido clavulânico; 2.77% à ampicilina e ciprofloxacina (1/36), 11.11% ao cloranfenicol (4/36), 8.33% (1/36) à ceftriaxona, 5.55% (2/36) à gentamicina e 8.33% (1/36) à tetraciclina. Outros isolados apresentaram resistência total aos agentes, sendo 8.33% (1/36) resistentes à + ácido clavulânico, 33.33% (12/36) à ampicilina, 13.88% (5/36) ao cloranfenicol, 5.55% (2/36) à gentamicina e 83.33% (30/36) à tetraciclina.

Os genes *IpaB*, *IpaC* e *IpaD* são partes essenciais da maquinaria molecular necessária para a invasão bacteriana localizados numa região do plasmídio de virulência denominada ilha de patogenicidade. As enterotoxinas *Shet-1* e *Shet 2* de *S. flexneri* e a uma enterotoxina de *S. dysenteriae* a *Stx1* ou Shiga-like toxina, denominada aqui como *EVT*. O *ial* sendo responsável por direcionar a penetração da bactéria nas células epiteliais, também foi escolhido e ainda o membro *IpaH*, importante na modulação da resposta imune. Foram escolhidos fatores transcricionais *VirF* e *invE* codificados no plasmídio de virulência e reguladores que reconhecem desde alterações de temperatura corpórea, como alterações ambientais até mesmo modificações após a entrada da bactéria no hospedeiro. Foi usado um marcador (*uidA*), não associado fator de patogenicidade, utilizado para detecção de por duplex PCR em tempo real para detecção

de amostras de *Shigella* e EIEC tendo como alvo o gene que codifica para a beta-glucuronidase, como uma espécie de marcador “neutro”.

O primeiro critério analisado foi a diarreia, pois todas as trinta crianças que participaram do estudo relataram processo diarréico direta ou indiretamente. A Figura 1 mostra as frequências encontradas após a tipagem por PCR das trinta e seis *Shigella* spp seguindo nossos primers mostrou grande predominância de *Ipa BCD*, em 75% das amostras (27/36), seguido de *IpaH* e *Shet-1A* 55,5% (20/36) respectivamente, e depois *Shet-1B* 47,2% (17/36) dos isolados. *Shet-2*, *VirF* e *invE* apareceram com frequências de 36,1%, ou seja, em 13 amostras dos 36 isolados de *Shigella* coletados. Enquanto que o fator *Ial* apareceu na metade das amostras (18/36). Um aspecto interessante a se destacar nesta análise preliminar foi baixa frequência de *EVT* ou a *StxI* (shiga-like) que é toxina de *S. dysenteriae* *EVT* somente em 16%, (6/36). Esta espécie foi a menos encontrada em nosso estudo. Segundo as análises sorológicas a frequência de *S. dysenteriae* foi de 2,5%, porém baseada na tipagem molecular a incidência desta espécie seria maior.

Outros sintomas foram usados nas análises e comparados com as frequências das tipagem por PCR. Quando o critério febre foi analisado, não foram verificadas alterações na frequência dos fatores de virulência que estivessem relacionados com secreção de proteínas das bactérias tais como *Ipa BCD*, *Shet-1A*, ou com fatores de transcrição *VirF* ou *invE*, tampouco com o marcador *uidA* (Figura 2A). No entanto, dois fatores de virulência relacionados na modulação da resposta imune ou na resposta inflamatória induzida por células epiteliais no íleo de coelho, como são os exemplos de *IpaH* e *Shet-2* respectivamente foram observadas alterações na frequência dos fatores de virulência. O *IpaH*⁺ nas crianças com febre apareceu em 60% (18/30) das amostras versus *IpaH*⁺ sem febre 33,3% (2/6). O *Shet-2*⁺ apareceu em 40,0% (12/30) das

crianças com febre em comparação versus *Shet-2+* sem febre 16,6% (1/6). Houve redução sensível, entretanto estatisticamente não foi significativa.

Quando o sintoma desidratação foi avaliado, esperava-se encontrar diferenças na frequência das enterotoxinas *Shet-1* e *Shet-2* conhecidas por ser reguladas por ferro, pois é bem estabelecido que elas alterem o transporte de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, in vitro e in vivo. A Figura 2B mostra apenas redução considerável na frequência de *Shet-1B* entre as crianças com ou sem desidratação. *Shet-1* é um complexo protéico de 55 kDa que é codificado no cromossomo exclusivamente por *Shigella flexneri* composto por duas subunidades *Shet-1A* e *Shet1B*. Crianças com desidratação cuja *Shigellas* apresentaram *Shet-1A+* foram frequentes em 65.2% (ou seja, 15/23) versus em 38.4% dos isolados (5/13) do grupo das crianças que tiveram *Shet-1A+* porém sem desidratação. Da mesma forma, crianças com desidratação cuja *Shigellas* apresentaram *Shet-1B+* foram frequentes em 65.2% (15/23) versus em 7.6% dos isolados ou 1/13 das crianças sem desidratação ou apenas um isolado desse grupo que apresentou *Shet-1B+* (Figura 2B, estrela). O único isolado *Shet-1B* no grupo sem desidratação chamou a atenção, pois se tratava de uma criança que tinha 9,5 anos de idade. Em relação ao *Shet-2*, crianças com desidratação cuja *Shigellas* apresentaram *Shet-2+* foram frequentes em 39.1% ou 9/23 versus em 30.7% das crianças que tiveram isolado *Shet-2+* sem desidratação (4/13).

Para avaliar processo lesivo do intestino critério sangue nas fezes foi analisado. Em relação ao sangue visível, nenhuma redução na frequência dos fatores de virulência ficou evidente comparando o grupo de crianças com sangue visível nas fezes daquelas que não apresentavam sangue nas fezes (Figura 2C). Utilizando um critério mais rigoroso e preciso, na qual é utilizada uma reação química para detecção do grupamento férrico da hemoglobina, foi possível verificar uma diferença na frequência de 72.7%

(16/22) *Shigellas* apresentando *IpaH*⁺ em crianças com diarreia com sangue oculto versus crianças diarreicas sem sangue oculto e *IpaH*⁺ 28.5% (4/14) (Figura 2D, estrela). Em relação à *IpaBCD*, nenhuma diferença foi encontrada com as *Shigellas* nos grupos de crianças de diarreicas com sangue oculto (*IpaBCD*⁺ 77.2% (17/22)) ou sem sangue oculto (*IpaBCD*⁺ 71.4% (10/14)). Nenhuma diferença foi encontrada com o fator *ial*, em ambos os grupos 50% *ial*⁺ 50% (11/22) crianças com sangue oculto e *ial*⁺ 50% (7/14) no grupo de crianças diarreicas sem sangue oculto nas fezes. Análise realizada com fator *Ial* não foi encontrada nenhuma evidência que demonstrasse associação com algum sintoma analisado neste estudo.

As frequências de *Shet-1B* na Figura 2B mostraram uma redução considerável no grupo de crianças com desidratação. Para verificar se essa redução entre os grupos de crianças era significativamente diferente, nós submetemos análise de contingência. Como se podem verificar na Figura 3A a presença de *Shet-1B* (*Shet-1B*⁺) foi bem diferente quando se compara as crianças que tiveram desidratação em relação às não desidratadas (16/1). Assim como, criança infectada com uma *Shigella* sem *Shet-1B* (*Shet-1B*⁻) parece uma característica da shigelose sem desidratação, segundo tabela de contingência e Figura 3A ($\chi^2 = 12.76$; alfa <0.05; P=0.0004).

Diante destes achados, algumas questões sobre fatores de risco associados a estes achados foram colocadas. Em relação às condições sanitárias, a falta de saneamento é um problema bem conhecido, cerca de menos de 7% da população da cidade de Manaus possui saneamento básico e todas as crianças participantes até o momento do estudo habitavam áreas desprovidas de saneamento. Portanto todas as crianças estavam sob influência de fator de risco facilitador. A idade foi questionada para avaliar se ela seria um fator predisponente a desidratação nos grupos de crianças. Os grupos foram divididos em 4 e a média de idade das crianças de cada grupo foi

distribuída de seguinte forma: com ou sem desidratação e com ou sem *Shet-1B* (Figura 3B). É preciso levar em consideração o predomínio da faixa etária das crianças foi abaixo de 5 anos e certamente poderia provocar um viés nesta análise (dados não mostrados). Contudo não foi observada diferença na média de idade, indicando idade não influenciou como fator predisponente. Medidas para avaliar as condições de nutrição das crianças não foram usadas neste estudo. Como as crianças viviam em áreas sem saneamento básico, com fator de risco predisponente importante (idade), tempo de amamentação foi perguntado para avaliar se ele poderia funcionar como uma atenuante, ou seja, influenciando *inversamente* a algum possível fator de risco agravante não previsto na pesquisa. Avaliando o tempo de amamentação das crianças divididos em dois grupos (*Shet1B+* versus *Shet-1B-*) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 3C). A equivalência no tempo de amamentação nos dois grupos reforça o potencial do *Shet-1B* funcionando como um fator agravante à desidratação shigelose.

Shet-1 de *Shigella flexneri* é uma enterotoxina protéica de 55 kDa, podendo ser encontrada em outras espécies de *Shigella*, composto por duas subunidades *Shet-1A* e *Shet-1B* que são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano. Análise de contingência foi realizada para avaliar a influencia do complexo *Shet-1* e suas subunidades separadamente em relação à desidratação. Para análise as crianças desidratadas versus sem desidratação foram separadas em quatro grupos de acordo com a presença ou não de *Shet-1A+* e/ou *Shet1B+* (Figura 3D). Segundo tabela de contingência ($\chi^2 = 13.65$; $P=0.0034$), como se esperava, a presença do complexo *Shet-1A+/Shet1B+* influenciou bastante como um fator agravante na desidratação, pois todas as *Shigellas* que tinham o complexo provocaram desidratação (11/0). Mesmo algumas *Shigellas* onde a existência do complexo não ficou evidente segundo a nossa tipagem

(*Shet-1A-/Shet1B+*), a presença de *Shet-1B* esteve influenciando no sintoma de desidratação (5/1). O inverso, presença de *Shet-1A* e ausência de *Shet1B* (*Shet-1A+/Shet-1B-*) não influenciaram como fator agravante na desidratação na shigelose (Figura 3D).

É conhecido que a enterotoxina 2 (*Shet-2*) induz alterações na homeostase no íleo de coelho. Por último foi avaliado a combinação da enterotoxina *Shet-2* e *Shet-1B* na influência da desidratação na shigelose (Figura 3E). Segundo avaliação pela tabela de contingência ($\chi^2 = 12.98$; $P=0.0047$), pôde-se constatar que as *Shigellas* contendo *Shet-1B+* influenciaram como um fator agravante, independentemente de presença de *Shet-2+*, segundo nossa tipagem de PCR. É bem estabelecido que a subunidade *Shet-1A* é responsável pela a atividade secretora da subunidade *Shet-1B* que é reconhecidamente envolvida na ligação irreversível da toxina ao receptor enterócito. Por outro lado, *Shet-2* está relacionado à regulação da inflamação e processo febril.

Em relação às enterotoxinas os nossos achados indicaram apenas uma tendência entre em relação a *Shet-2* e processo febril observada na forma de uma redução da frequência, que não foi traduzida estatisticamente. No entanto, os resultados apresentados acima confirmaram quase que exclusivamente o potencial patogênico da subunidade *Shet-1B* associados ao processo de desidratação.

A análise inicial mostrou que *IpaH* foi o segundo fator de virulência mais freqüente, e ainda, diferenças nas freqüências de *IpaH+* foram observadas quando comparadas entre os grupos de crianças de acordo com o estado febril, embora elas não tenham sido estatisticamente significativas. Utilizando-se de um critério mais rigoroso e preciso, ficou evidente a diferença na freqüência de *IpaH+* de *Shigellas* em fezes diarréicas com sangue oculto em relação *IpaH+* em fezes sem sangue oculto (Figura 2D, estrela). Por esta razão foi submetida uma análise de contingência para avaliar se

esta diferença era significativa. A análise confirmou que as crianças com diarreia sanguinolenta era provocada por *Shigellas* carregando o fator de virulência *IpaH*, $\chi^2 = 12.75$; $P=0.0093$, (Figura 4A). Da mesma forma a idade foi questionada para avaliar se ela seria um fator predisponente ao sangue oculto e *IpaH*⁺. Não foi observada nenhuma diferença, indicando idade não influenciou como fator predisponente (Figura 4B). Tempo de amamentação também foi comparado entre as crianças divididas em os grupos (*IpaH*⁺ versus *IpaH*⁻) e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 4C). Os dados de tabela de contingência de *IpaH*⁺ e sangue oculto e a equivalência no tempo de amamentação nos dois grupos de criança reforçam o potencial do *IpaH*⁺ como fator de virulência na shigelose.

As proteínas *IpaBCD* de *S. flexneri* são essenciais para a invasão da célula hospedeira, sobrevivência intracelular, controlam a secreção e translocação de outras proteínas para as células hospedeiras eucarióticas. Embora a análise de contingência não tenha mostrado uma associação com o processo lesivo (Figura 4D), a frequência de *IpaBCD*⁺ foi muito grande (75,0%) nas crianças que tiveram diarreia, corroborando com os dados da literatura sobre a essencialidade desta maquinaria na sobrevivência da *Shigella* na célula hospedeira. Sangue oculto indica hemorragia discreta caracterizada por um processo lesivo na parede epitelial do intestino provocada pela invasão da bactéria. Como *IpaH* é importante fator bacteriano modulador da resposta imune. Esta interação processo lesivo e *IpaH* modulando a resposta inflamatória acaba facilitando a invasão e conseqüentemente mais hemorragia nas fezes.

A patogenicidade da *Shigella* é mediada por um sistema de secreção proteínas tipo III (T3SS) codificada no plasmídio de virulência na qual injeta moléculas efetoras no epitélio do hospedeiro durante a infecção (Dorman & Porter, 1998). A expressão deste T3SS é estreitamente regulada por duas proteínas, VirF e invE. VirF é um tipo de

fator transcrição codificado no cromossomo e um ativador-regulador da transcrição do *invE*. O *invE* por sua vez é mais conhecido como *virB* (Adler et al, 1989; Kato et al, 1989) também é um fator de transcrição codificado no plasmídio e ativa a transcrição de *mxi* e genes que codificam os componentes do T3SS (Beloin & Dorman, 2003). A tipagem de PCR mostrou que todos os isolados de *Shigella invE+* tinham os genes *IpaBCD+* (n=13) e a maioria (n=9) tinha *IpaH+* (Figura 5A). Em contra partida, foram encontradas vinte três isolados sem *invE* (*invE-*), mas em boa parte deles foi encontrada os genes *IpaBCD* (n=14) e *IpaH* (n=11). Paralelamente, a tipagem de *VirF* mostrou resultados semelhantes (Figura 5B), os genes *IpaBCD* foram encontrados em todos os isolados *VirF+* (n=13) e *IpaH* na maioria destes isolados (n=8). Nos isolados *VirF-*, os genes *IpaBCD* e *IpaH* também foram encontrados (n=14 e n=12, respectivamente). Os isolados *invE+* e *VirF+* (n=8) foram todos *IpaBCD+* e em cinco deles foram encontrados *IpaH+* (dados não mostrados). Segundo a literatura, que é baseada em amostras padrão, o fator de transcrição *VirF* é um tipo de regulador-ativador da transcrição do *invE*, que por sua vez ativa a transcrição de *mxi* e genes dos componentes do TTSS (por exemplo os *Ipas*). Embora seja prematuro afirmar, os resultados baseados nos isolados selvagens podem indicar que o controle de regulação e transcrição dos genes da maquinaria SST-3 possa ser realizado por circuitos alternativos (Figura 5A-C).

DISCUSSÃO

A shigelose é uma doença manifestada desde uma leve diarreia até uma severa disenteria, caracterizada pela passagem em pequenos volumes de fezes podendo conter sangue, muco e leucócitos fecais (Angelini et al, 2009). Segundo a literatura, as epidemias e pandemias de disenteria severa foram causadas por *S. dysenteriae* enquanto que *S. flexneri* tem sido frequentemente associada à shigellose pediátrica endêmica nos países em desenvolvimento. Por outro lado, a espécie *S. boydii* tem sido encontrada em focos endêmicos dispersos e a *S. sonnei* causadora da diarreia do viajante nestes mesmos países. Entretanto, shigellose não é exclusividade de países em desenvolvimento, pois surtos têm sido reportados em países desenvolvidos (Levine, et al. 2007).

Aqui, trinta e seis isolados de *Shigella* spp oriundos de uma pesquisa na qual se investigou a etiologia da diarreia infantil de um total de 1500 crianças na zona leste-sul-oeste de Manaus, no período de agosto de 2007 a julho de 2009. A identificação convencional confirmou a *Shigella flexneri* sendo a mais freqüente, como é reportado na literatura a shigellose pediátrica. No entanto, não menos importantes foram os achados de *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* na incidência da shigellose pediátrica. Os resultados da identificação bioquímica e sorológica obtidos condizem com o observado nas demais localidades do Brasil, com a predominância de *S. flexneri* e em segundo lugar, *S. sonnei* ou *S. boydii* e, por último, *S. dysenteriae* (Souza et al, 2002; Peirano et al, 2006; Silva et al, 2008; Bastos e Loureiro, 2011; Nunes et al, 2012). Estes dados estão de acordo com estudos que dizem que *S. flexneri* é a espécie mais comum em países em desenvolvimento, sendo a *S. sonnei* a mais comum em países mais desenvolvidos e industrializados (Kotloff et al, 1999; Penatti et al, 2007).

A utilização de agentes antimicrobianos e os fatores ambientais de transmissão têm um importante papel no surgimento e na disseminação dos mecanismos de resistência a antibióticos (Krummennauer et al, 2012). O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e a transferência horizontal de genes têm levado ao aparecimento de cepas de *Shigella* resistentes aos antibióticos comumente utilizados; sendo que os padrões de resistência são influenciados pela localização geográfica, ano em que os isolados foram obtidos, classe dos agentes antimicrobianos e a pressão exercida pelo uso destes antibióticos (Peirano et al, 2006). A WHO (2005) recomendou que a escolha do medicamento fosse feita baseada nos dados recentes de susceptibilidade de cepas isoladas na região e caso estes dados não estejam disponíveis, devem ser observados os dados de países vizinhos e de recentes epidemias regionais, entretanto, em casos de shigellose, são recomendados: ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas, pivmecillinam, ceftriaxona e azitromicina. Todas as cepas isoladas neste estudo se mostraram suscetíveis à kanamicina e ao ácido nalidíxico. Alguns isolados apresentaram resistência intermediária aos agentes e dentre estes é importante destacar o aparecimento de um isolado resistente (intermediária) à ciprofloxacina e 1 resistente (intermediária) à ceftriaxona, que são os antibióticos recomendados pela OMS. Em um estudo realizado em Teresina-PI com cepas de *Shigella* isoladas entre 2004 e 2007, todas elas foram sensíveis ao ácido nalidíxico, à ciprofloxacina e à ceftriaxona, apresentando resistência aos outros antimicrobianos testados (Nunes et al, 2012). No estado do Pará foram estudadas cepas de *Shigella* isoladas entre 1979 a 2009 e todas elas também se mostraram suscetíveis à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico, além da cefotaxima, ceftazidima e nitrofurantóina; apresentando resistência aos outros antimicrobianos testados (Bastos e Loureiro, 2011). Estes dados contribuem para o monitoramento das cepas regionais de forma a garantir tratamentos eficazes para os pacientes; e é de suma

importância que este monitoramento seja freqüente para observar o surgimento de novas cepas resistentes.

Dependendo do estado nutricional a shigelose desaparece em poucos dias e a recuperação é rápida (CDC, 2009). No entanto, nos casos de desnutrição as infecções podem ser recorrentes e causar retardo no crescimento (Niyogi 2005). Embora neste estudo não tenha sido usados critérios nem parâmetros para avaliar as condições nutricionais das crianças, como boa parte das crianças eram bem jovens, foi analisado o tempo de amamentação. Este critério, além de sugerir um risco menor à desnutrição, sendo recomendado pelo Ministério da Saúde e UNICEF (MS, 2007) em função de vários benefícios que esta prática traz (entre elas, a capacidade de proteger o bebê contra doenças como a diarreia); poderia associar algum efeito protetor contra alguma sintomatologia detectada durante ou após a anamnese. Chisti et al (2010) relataram que bebês amamentados possuem mais capacidade de resistir à complicações resultantes do agravamento da infecção por *Shigella*, como convulsões, encefalopatia, nanismo e morte. Neste estudo, nenhuma criança participante apresentava quadro grave de shigelose pediátrica, demonstrando que este fator não influenciou como um fator de risco facilitador a severidade. Em contra partida quando as crianças foram agrupadas de acordo com os sintomas vômito, desidratação e sangue nas fezes, o tempo de amamentação não contribuiu para atenuar estes sintomas.

A shigelose é uma patologia característica de locais sem saneamento básico ou mesmo onde há dificuldade em manter a higiene apropriada (Zychlinsky, et al. 1996; Wiwanitkit 2006; Niyogi et al. 2005). O acesso limitado à água limpa e a falta de intervenção médica apropriada contribuem para os altos índices de mortalidade, especialmente em crianças (Schroeder and Hilbi 2008). A falta de saneamento é um problema bem conhecido da cidade de Manaus, pois apenas uma parcela inferior 7% da

população possui saneamento básico. Como todas as crianças participantes habitavam áreas desprovidas de saneamento, elas estavam sob influência de fator de risco facilitador.

A patogênese da shigellose se deve às ilhas de patogenicidade (IPAs) no genoma da *Shigella*, que foram primeiramente descritas no DNA cromossômico, mas também em plasmídios e bacteriófagos. (Hacker e Kaper 2000). Estes fatores de virulência compreendem um sistema de secreção proteínas tipo III (T3SS) e moléculas efetoras no epitélio do hospedeiro, que são essenciais para a invasão e sobrevivência da bactéria no meio intracelular, como na modulação da resposta das células hospedeiras (Dorman & Porter, 1998; (Sansone e Egile, 1998). A expressão deste T3SS é estreitamente regulada por duas proteínas, VirF (fator transcrição do cromossomo) e invE (fator de transcrição codificado no plasmídio) (Adler et al, 1989; Kato et al, 1989; Beloin & Dorman, 2003). Segundo a literatura que é baseada em amostras padrão o fator de transcrição VirF é um tipo de regulador-ativador da transcrição do invE, que por sua vez ativa a transcrição de mxi e genes dos componentes do TTSS (por exemplo os Ipa). A tipagem mostrou o que se esperava a presença de IpaBCD+ em todos virF+ e/ou invE+. Entretanto em outros isolados IpaBCD+, foram encontrados virF- ou invE-. Em relação ao IpaH+, aqui foi avaliado apenas um dos cinco genes IpaH contido no genoma de *Shigella*. Nossos resultados baseiam-se em isolados selvagens e indicam que o controle de regulação e transcrição possa ser realizado por outros circuitos.

A região central do plasmídio de virulência inclui genes do Ipa que codificam proteínas efetoras e chaperonas citoplasmáticas dentre eles a IpaB, IpaC e IpaD. As proteínas IpaB e IpaD são necessárias na composição da “agulha” da SST-3 e portanto essencial na secreção e ainda importante na invasão na célula hospedeira (Shen et al, 2010). A proteína IpaC por sua vez tem a função de induzir alterações na célula

hospedeira (Bourdet-Sicard et al, 2000; Schroeder e Hilbi, 2008). Infecção de *Shigella* e inflamação no tecido seria provocado via ligação da proteína *IpaB* causando a morte do macrófago induzida por apoptose via caspase-1, com liberação de IL-1 β em biologicamente ativa (Zychlinsky e Sansonetti 1997; Hilbi et al. 1998). O mecanismo de morte pode envolver a formação de um poro na membrana plasmática das células infectadas, que é dependente dos genes de virulência *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*.

As proteínas *IpaBCD* de *S. flexneri* são essenciais para a invasão da célula hospedeira, sobrevivência intracelular, controlam a secreção e translocação de outras proteínas para as células hospedeiras eucarióticas. A diarreia foi a característica clínica apresentada em todas as trinta e seis crianças que participaram deste estudo e a tipagem mostrou que *Ipa BCD* foram os fatores de virulência mais predominantes seguido de *IpaH*.

Quando o critério febre foi comparado, alteração na frequência de *IpaH* foi observada corroborando com seu papel na modulação da resposta imune de células epiteliais no íleo de coelho, conforme encontrado na literatura. A análise de contingência baseado no critério de sangue oculto indicou que *Shigellas* carregando o fator de virulência *IpaH+*, importante fator bacteriano modulador da resposta imune inflamatória provocava pelo processo invasivo da *Shigella* levando um quadro de diarreia sanguinolenta. Estes resultados são coerentes segundo a literatura, pois isolados carregando tais genes os tornariam “fenotipicamente invasivos” e capazes de modular a resposta do hospedeiro (Sansonetti, 2001).

No cromossomo de *Shigella* podem ser encontrados genes que codificam enterotoxinas, tais como a Shiga toxina (Stx) da *S. dysenteriae* única entre as espécies de *Shigella* a sintetizar uma poderosa citotoxina (Hale, 1991). Em ambas as cepas, os genes que codificam Stx estão cromossomicamente codificados e ligados a sequências

de bacteriófagos lambdóides. Neste estudo a prevalência de *S. dysenteriae* foi a muito baixa, mesmo assim a Stx1 (shiga-like) foi detectada. A enterotoxina Shet-1 de *Shigella flexneri* é uma proteína de 55 kDa, composta por duas subunidades (shet-1A e shet-1B) codificadas no cromossomo bacteriano e podendo ser encontrada em outras espécies de *Shigella* (Sansoneetti, 2001; Niyogi, 2005).

É bem estabelecido que as enterotoxinas principalmente as Shet-1 e Shet-2 alteram o transporte de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, in vitro e in vivo. Era esperado encontrar diferenças na frequência das enterotoxinas quando o sintoma desidratação fosse avaliado. Análise de contingência avaliou a influência do complexo shet-1 e suas subunidades separadamente em relação à desidratação, e mostrou que as frequências de shet-1B reduziram consideravelmente no grupo de crianças sem desidratação. A análise de contingência confirmou estatisticamente o potencial da subunidade shet-1B como um fator agravante para desidratação na shigelose e em contra partida, uma criança infectada com *Shigella* sem shet-1B (shet-1B-) tem uma característica da shigelose sem desidratação. Quando a presença do complexo shet-1A+/shet1B+ foi avaliado, a tabela de contingência confirmou a influência como um fator agravante na desidratação, conforme esperado. Entretanto a presença de shet-1A e ausência de shet1B (shet-1A+/shet-1B-) não influenciaram como fator agravante na desidratação na shigelose. A subunidade shet-1A tem um papel secretório da subunidade shet-1B que é reconhecidamente envolvida na ligação irreversível da toxina ao receptor enterócito. Portanto estes achados reforçam o papel do shet-1B como potente fator de virulência das *Shigellas* podendo levar a complicações relacionadas à desidratação no quadro diarréico da shigelose.

Se a enterotoxina shet-1 provoca desequilíbrio no transporte intestinal de água e eletrólitos no intestino delgado de coelho, por outro lado, a shet-2 codificado no

cromossomo de virulência está relacionada com a regulação da inflamação e processo febril (Fasano, et al., 1995, Nataro, et al., 1995). Quando o critério febre foi comparado, uma frequência maior *Shet-2+* em as crianças febris em relação a não febris foi verificada. Embora os nossos achados indiquem apenas uma suspeita, (mesmo não traduzida estatisticamente) eles estão corroborando com o que está estabelecido na literatura na qual a contribuição de *Shet-2* está relacionada na indução da inflamação nas células epiteliais durante a infecção por *Shigella* (Farfan et al. 2011).

Nossos achados mostraram evidências sobre o potencial patogênico quase que exclusivos da subunidade *shet-1B* no processo de desidratação, e de *IpaH* na febre, na lesão do intestino evidenciado pelo diarreia sanguinolenta. Além destes, outros observados aqui tais como, *IpaBCD* (o mais freqüente e envolvido no processo febril e diarreico) e *shet-2* (também no processo febril), reunidos dariam informações para contribuir com pouca literatura que existe sobre isolados de *Shigella* selvagens oriundos de crianças com quadro diarreico com ou sem shigelose. Portanto, este estudo vem consolidar a importância de encontrar caminhos para bloquear a toxicidade destes principais fatores de patogenicidade associados a sintomatologia da shigelose seja via vacinal ou por outras medidas de controle terapêutico.

Agradecimentos: Deixamos expressos nossos agradecimentos à equipe que participou da coleta e a todas as pessoas do nosso grupo de pesquisa por todo o empenho e dedicação; agradecemos a todos os familiares de pacientes que concordaram em colaborar com esta pesquisa; e também às instituições: Hospital da Zona Sul, Hospital da Zona Leste e Hospital da Zona Oeste. Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ AMAZÔNIA), Universidade Federal do Amazonas, FAPEAM e CAPES, sem as quais este estudo não teria sido possível.

Referências:

Adler B, Sasakawa C, Tobe T, Makino S, Komatsu K, Yoshikawa M 1989. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 3:627–635.

Angelini M, Stehling EG, Moretti M L, Silveira W D 2009. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. Braz. J. Microbiol., vol.40, n.3, p. 685-692.

Bastos FC, Loureiro ECB 2011. Antimicrobial Resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., vol.44, n.5, p. 607-610.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, AND Turk M 1996. Antibiotic susceptibility by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Patol, vol. 45, n. 4, p. 493-496.

Beloin C, Dorman CJ 2003. An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. Mol Microbiol 47:825-838.

Boetourdet-Sicard R, Egile C, Sansonetti PJ, Nhieu GTV 2000. Diversion of cytoskeletal processes by *Shigella* during invasion of epithelial cells. Microbes and Infection, vol. 2, n. 7, p. 813–819.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). National Antimicrobial Resistance Monitoring System annual report. Atlanta, USA: CDC; 2009.

Chisti MJ, Faruque AS, Khan WA, Das SK, Zared MB, Salam MA 2010. Characteristics of children with *Shigella* encephalopathy: experience from a large urban diarrhea treatment center in Bangladesh. Pediatric Infectious Disease Journal, vol. 29, n. 5, p. 444-447.

Coster TS, Hoge CW, Vandeverg LL, Hartman AB, Oaks EV, Venkatesan, MM, Cohen D, Robin G, Fontaine-Thompson A, Sansonetti PJ, Hale TL 1999. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. Infection and Immunity, vol. 67, n. 7, p. 3437-3443.

Dorman, CJ, Porter ME 1998. The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol.Microbiol.* 29:677–684.

Farfan MJ, Toro CS, Barry EM, Nataro JP 2011. *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61(3): 332–339.

Faruque SM, Khan R, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Ahmad QS, Azim T, Nair GB, Takeda Y, Sack DA 2002. Isolation of *Shigella* dysenteriae type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, n. 8, p. 3908-3913.

Fasano A, Noriega FR, Manieval DR Jr, Chanasongcram S, Russel R, Guandalini S, Levine MM 1995. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *Journal Clinical Investigation* 95:2853–2861.

Gómez-Duarte OG, Bai J, Newel E 2009. Detection of *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter spp.* enteropathogens by three-reaction multiplex PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 63, n. 1, p. 1-9.

Grimont F, Lejay-Collin M, Talukder KA, Carle I, Issenhuth S, Le Roux K, Grimont PA 2007. Identification of a group of shigella-like isolates as *Shigella boydii* 20. *Journal of Medicine Microbiology* 56:749-54.

Hacker J, Kaper JB 2000. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annual Review of Microbiology*, vol. 54, p. 641-679.

Hale TL 1991. Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. *Microbiological Reviews*, vol. 55, n. 2, p. 206-224.

Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ, Zychlinsky A 1998. *Shigella*-induced Apoptosis Is Dependent on Caspase-1 Which Binds to IpaB. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 4, n. 49, p. 32895-32900.

Kane KA, Dorman CJ 2012. VirB-Mediated Positive Feedback Control of the Virulence Gene Regulatory Cascade of *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology*, vol. 194, n. 19, p. 5264-5273.

Kato J-I, Ito K-I, Naakamura A, Watanabe H 1989. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LLC-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: virF is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect. Immun.* 57:1391–1398.

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, ADAK G K, LEVINE M M 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 77, n. 8, p. 651-666.

Krummenauer EC, Carneiro M, Alves Machado JA, de Mello Rauber J, Adam MS, Muller LB, Persch MS, de Souza JG. 2012. The impact of antimicrobial resistance and the challenge for professionals. *American Journal Infection Control*. Oct 9.

Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB 2007. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, p. 540-553.

Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-Mcnair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, Clements JD, Pasetti MF, Picking WL 2012. Broadly Protective *Shigella* Vaccine Based on Type III Secretion Apparatus Proteins. *Infect. Immun*, vol. 80, n. 3, p. 1222-1231

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2007. Secretaria de Atenção à Saúde: Promovendo o Aleitamento Materno 2ª edição, revisada. Brasília: Álbum seriado, 18p.

Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA 2007. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 73, n. 10, p. 3380-3390.

Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, Levine MM, Morris JG JR 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* 63:4721–4728.

Niyogi SK 2005. Shigellosis. *The Journal of Microbiology*, vol. 42, n. 2, p. 133-143.

Nunes MR, Magalhães PP, Penna FJ, Nunes JM, Mendes EN 2012. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J Pediatr (Rio J)*, vol. 88, n. 2, 125-128.

Peirano G, Souza FDS, Rodrigues DDP 2006. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, n. 3, p. 245-250.

Penatti MP, Hollanda LM, Nakazato G, Campos TA, Lancellotti M, Angellin M, Brocchi M, Rocha MM, 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* [online], vol.40, n.2, p. 249-258.

Sansonetti PJ 2001. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 25, n. 1, p. 3-14.

Sansonetti P J, Egile C 1998. Molecular bases of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 74, p. 191-197.

Schroeder GN, Hilbi H 2008. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, n. 1, p. 134-156.

Shen DK, Saurya S, Wagner C, Nishioka H, Blocker AJ 2010. Domains of the *Shigella flexneri* type III secretion system IpaB protein involved in secretion regulation. *Infection and Immunity* 78 (12): 4999-5010.

Silva T, Nogueira PA, Magalhães GF, Grava AF, Silva LHP, Orlandi PP 2008. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 103, n. 7, p. 731-733.

Souza, EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, Silva L, Ejzenberg B, Okay Y 2002. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal De Pediatria*, vol. 77, n. 1, p. 31-38.

Talukde KA, Mondol AS, Islam MA, Islam Z, Dutta DK, Khajanchi BK, Azmi IJ, Hossain MA, Rahman M, Cheasty T, Cravioto A, Nair GB, Sack DA 2007. A novel serovar of *Shigella dysenteriae* from patients with diarrhoea in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, n. 5, p. 654-658.

Wiwanitkit V 2006. Sexuality Transmitted Shigellosis. *Sexuality and Disability*, vol. 24, n. 1, p. 69-71.

World Health Organization 2005. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cholera/publications/shigellosis/en/index.html>> acessado em: 22 de novembro de 2011.

Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, Sansonetti PJ 1996. In Vivo Apoptosis in *Shigella flexneri* Infections. *Infection and Immunity*, 64, 12, 5357-5365.

Zychlinsky A, Sansonetti PJ 1997. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends in Microbiology* 5:201-204.

Legendas

Figura 1. Frequência dos genes de virulência encontrados nos isolados de *Shigella*. Todas as crianças apresentavam diarreia.

Figura 2. Frequências dos isolados apresentando respectivamente cada gene de virulência separado em dois grupos, de acordo com o sintoma que a crianças apresentava (ou não) no momento da diarreia. Sintomas: A) febre, B) desidratação, C) sangue visível, D) sangue oculto.

Figura 3. Associação entre o gene Shet1B e a desidratação das crianças na shigelose. A) Análise de contingência avaliando a relação entre a presença do gene Shet1B e a desidratação das crianças com diarreia. B) Investigação do fator idade como fator de predisponente à desidratação. C) Avaliação do fator tempo de amamentação como atenuante. D) Análise de contingência avaliando a relação entre a presença do gene do complexo Shet1A e Shet1B e a desidratação das crianças com shigelose. E) Análise de contingência avaliando a relação entre a presença do gene Shet1B e Shet2 com a desidratação das crianças com shigelose.

Figura 4. Associação entre o gene IpaH e diarreia sanguinolenta das crianças na shigelose. A) Análise de contingência avaliando a relação entre a presença do gene IpaH e diarreia sanguinolenta das crianças com diarreia. B) Investigação do fator idade como fator de predisponente à desidratação. C) Avaliação do fator tempo de amamentação como atenuante. D) Análise de contingência avaliando a relação entre a presença do gene IpaBCD e diarreia sanguinolenta das crianças com diarreia.

Figura 5. Tipagem de genes *invE* e *VirF* nos isolados de *Shigella* selvagens em relação a concomitância com *IpaBCD* e/ou *IpaH*. A) Comparação dos isolados *invE*⁺ e *invE*⁻ carregando os genes da maquinaria SST-3. B) Idem, comparação dos isolados *virF*⁺ e *virF*⁻. C) Esquema de uma possível via reguladora alternativa entre os genes *VirF* e *invE* nos isolados onde um dos genes regulatórios foi ausente.

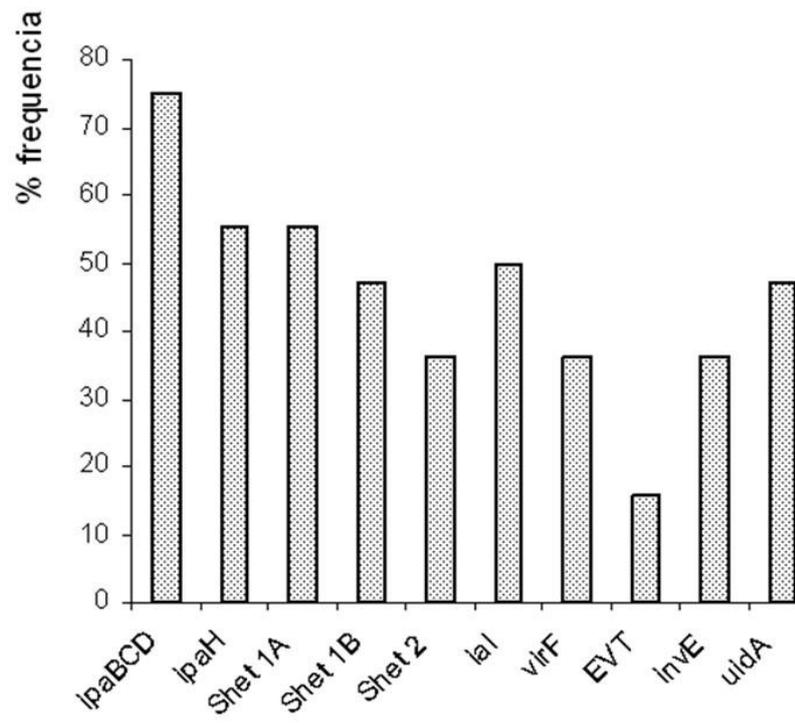


Fig 1

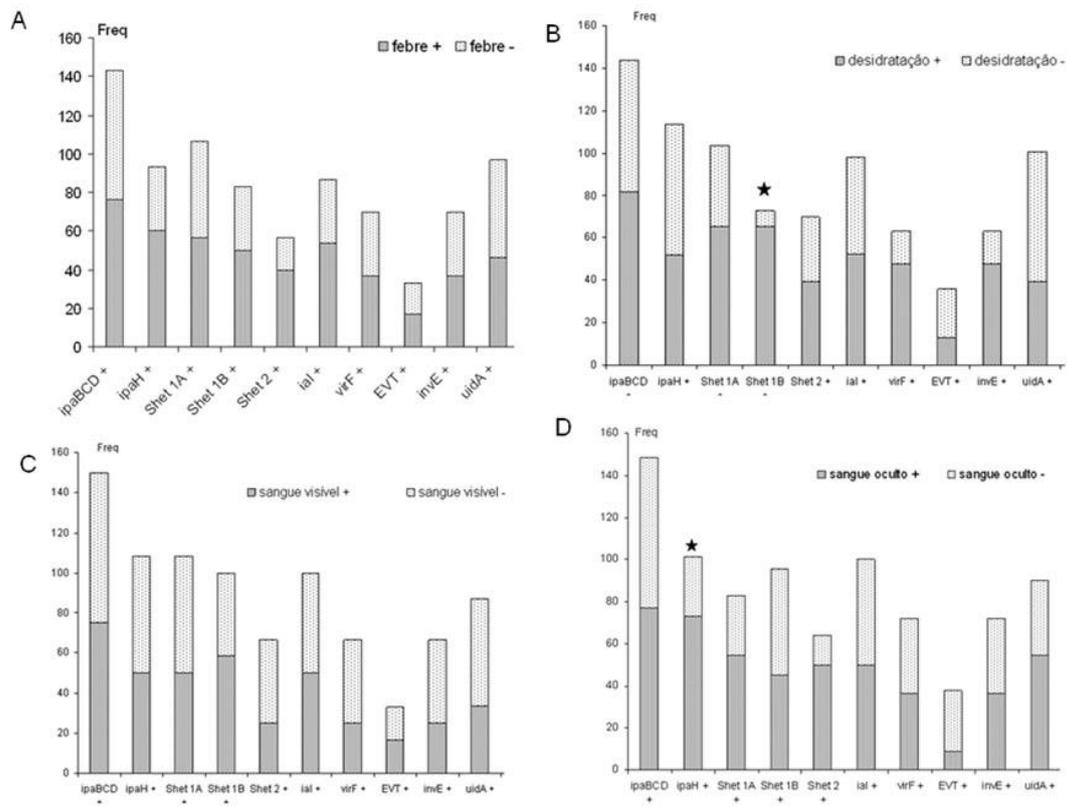


Fig 2

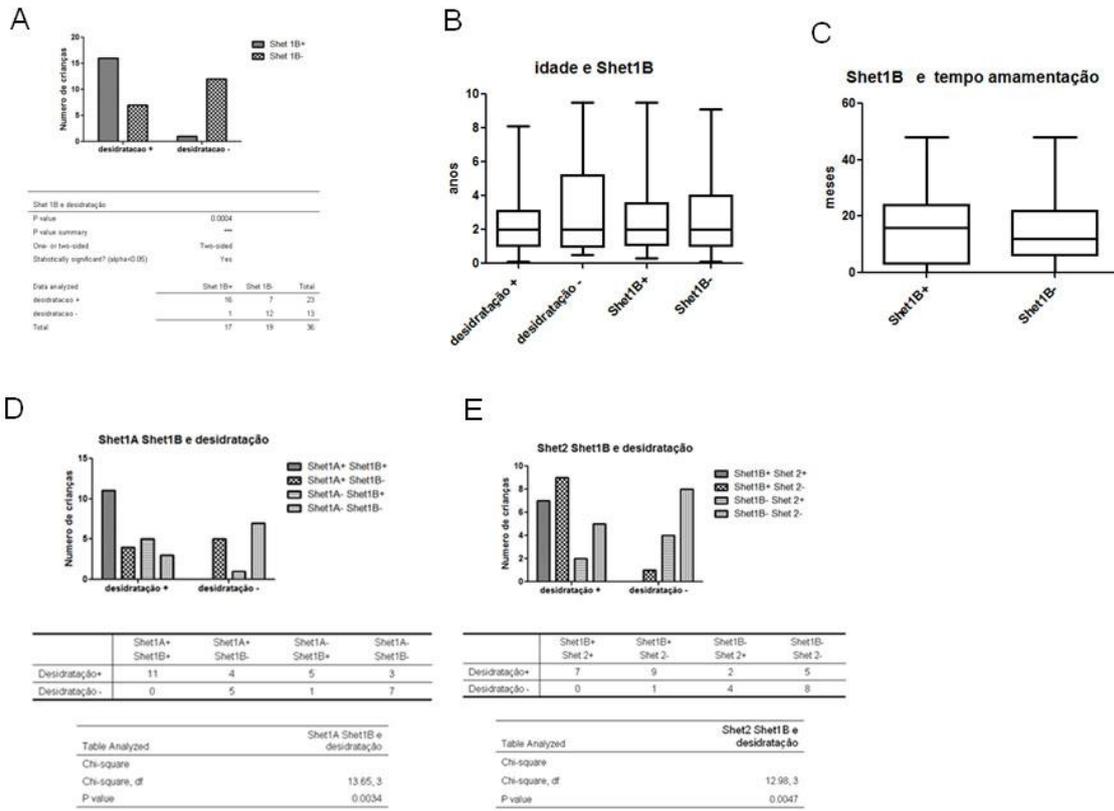


Fig 3

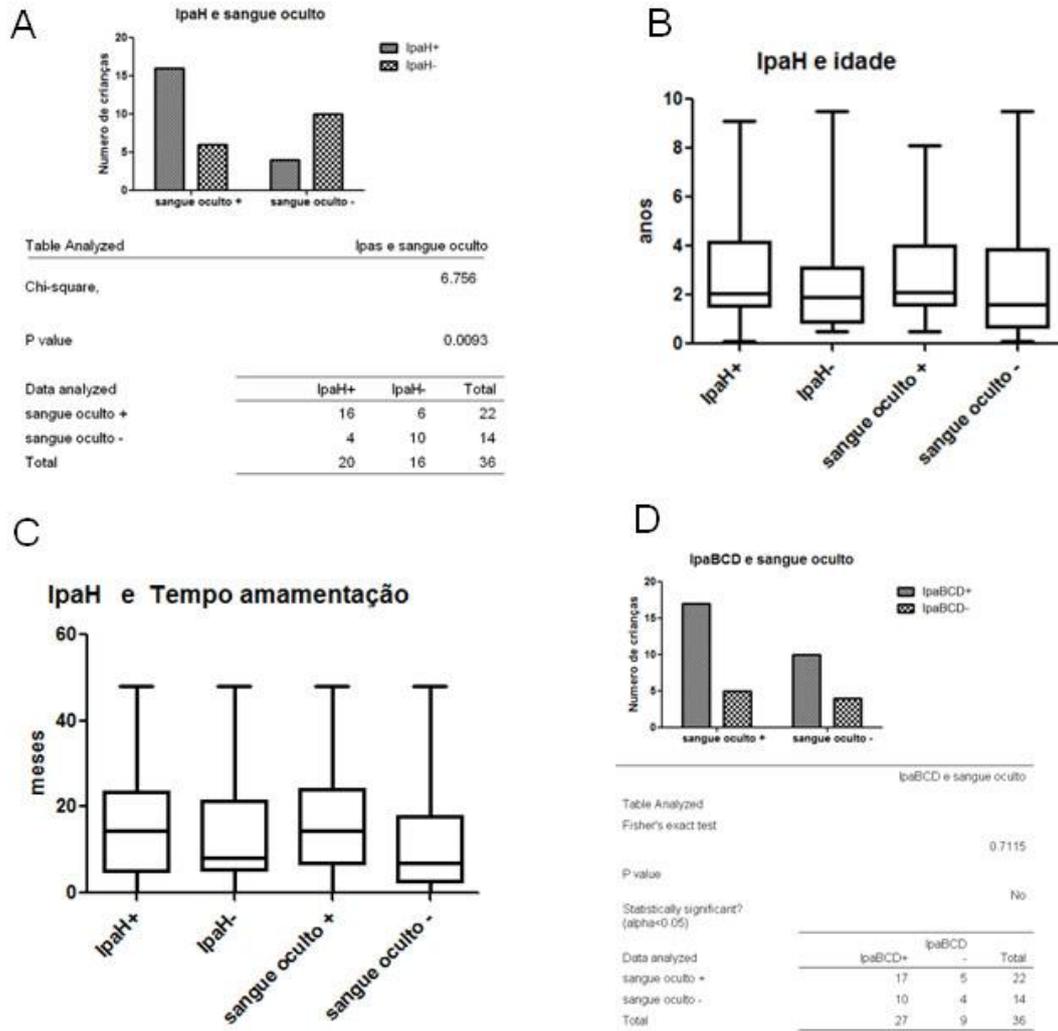


Fig 4

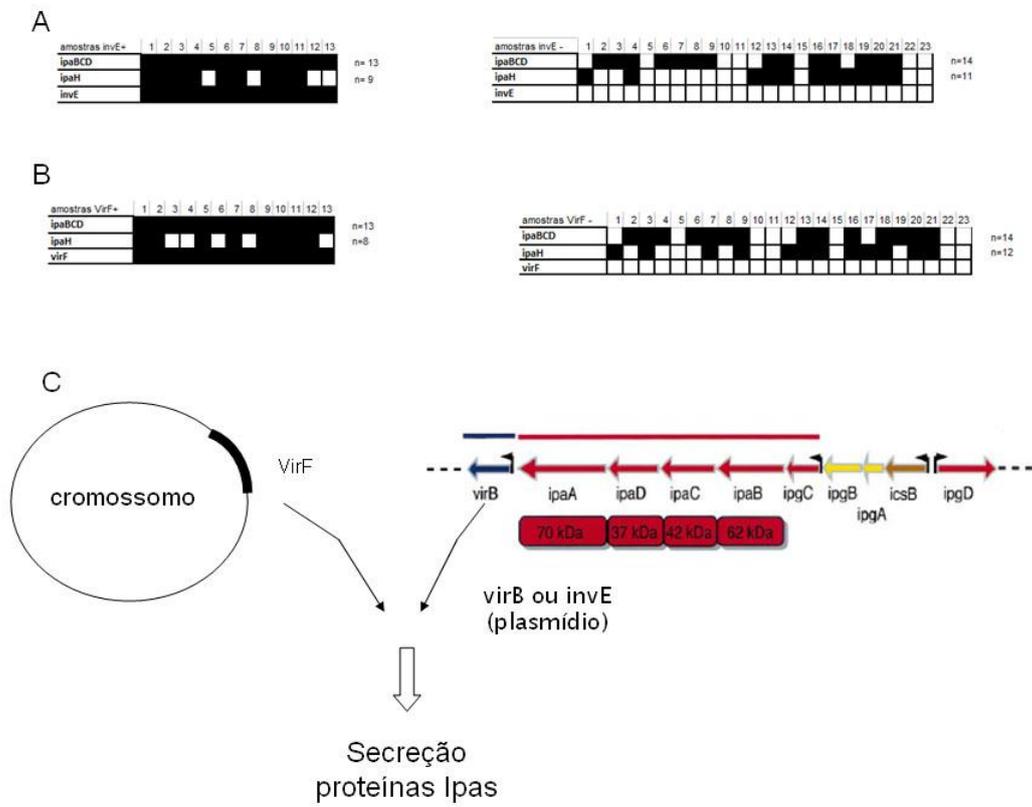


Fig 5

APÊNDICE IV

ARTIGO DE REVISÃO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA SCIENTIA
AMAZONIA***Shigella* sp e patogênese: uma revisão.****Resumo**

Shigella sp. é um gênero de enterobactérias gram-negativas responsáveis pela shigellose, a diarreia do viajante. São hábeis em invadir as células epiteliais da mucosa intestinal e utilizar algumas defesas do hospedeiro para facilitar sua entrada na célula. Podem levar o hospedeiro a ter um quadro leve de diarreia ou a um ciclo vicioso de desnutrição e disenteria severa, dependendo do estado nutricional do hospedeiro e de seu acesso a saneamento básico e tratamento médico. Esta revisão apresenta estudos realizados anteriormente a respeito das formas de interação da *Shigella* sp. com as células intestinais e suas consequências para o hospedeiro.

Palavras-Chave: *Shigella*, shigellose, diarreia, patogenicidade, genes de virulência, vacinas.

Abstract

Shigella sp. is a genus of gram-negative enterobacteria responsible for shigellosis, traveler's diarrhea. Are able to invade epithelial cells of the intestinal mucosa and use some host defenses to facilitate its entry into the cell. They can take the host to have a mild diarrhea or a vicious cycle of malnutrition and dysentery severe, depending on the nutritional status of the host and their access to basic sanitation and medical treatment. This review presents previous studies about the interaction forms of *Shigella* sp. with intestinal cells and its consequences for the host.

Key-words: *Shigella*, shigellosis, diarrhea, pathogenicity, virulence genes, vaccines.

1. Introdução

A síndrome diarreica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento. Os patógenos entéricos gram-negativos são os principais agentes etiológicos das diarreias infecciosas, responsáveis por mais de 3 milhões de morte ao ano (CDC 2004).

As bactérias do gênero *Shigella* foram isoladas pela primeira vez em 1896, no Japão, enquanto o Dr. Kyoshi Shiga estudava pacientes com disenteria (Shiga, 1898 *apud* Niyogi, 2005).

O organismo foi inicialmente denominado *Bacillus dysenteriae* e posteriormente foi classificado como gênero *Shigella* na edição de 1930 do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Shiga, 1906; *Bergey's Manual*, 1930; *apud* Trofa et al, 1999). O gênero *Shigella* é atualmente dividido em quatro espécies, classificadas com base nas diferenças bioquímicas e sorológicas: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* (Niyogi, 2005; Martinez-Becerra et al, 2012).

Organismos do gênero *Shigella* pertencem à tribo *Escherichia* da família *Enterobacteriaceae*.

São bacilos Gram-negativos pequenos, não encapsulados, não móveis, não esporulados e anaeróbios facultativos (Schroeder e Hilbi, 2008).

Com base nestes dados, o presente estudo teve por objetivo revisar artigos da literatura publicados anteriormente, relacionados às *Shigella* sp., incluindo as formas de interação desta bactéria com as células-alvo da patogênese.

2 Material e Método

Este estudo foi realizado através do levantamento de dados encontrados na literatura existente, sendo consultados artigos originais e de revisão. As buscas foram realizadas nos seguintes bancos de dados eletrônicos: PubMed, Periódicos Capes e Scielo, utilizando as seguintes palavras-chave, em português e em inglês, isolados ou combinados: *Shigella*, *Escherichia coli*, enterobacteriaceae, invasão celular, T3SS, MALDI-TOF, gyrB.

3 Revisão de literatura

3.1 Classificação por sorogrupos

1.1 Classificação por sorogrupos:

A classificação dos sorogrupos é baseada na combinação de um antígeno determinante presente na cadeia polissacarídica O, componente do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da parede celular (Huan et al, 1997; Niyogi, 2005). O LPS de uma bactéria consiste de três regiões: o lipídio A, um núcleo interno e repetidas subunidades do antígeno O. Na *Shigella*, esta subunidade é a tri-ramnose (rha)-*N*-acetil-glicosamina (*N*-ag), um tetrassacarídeo que é modificado pela ação de glicose e/ou acetato, dependendo do sorotipo. A glicosilação altera a conformação do LPS, tornando a bactéria mais protegida contra a resposta inflamatória do hospedeiro e facilitando a exposição da estrutura que a *Shigella* utiliza para invadir as células: o aparato de secreção do tipo 3 (T3SS). Portanto, a glicosilação do LPS promove a invasão bacteriana e a evasão do sistema imunológico, fato que pode ter contribuído para o surgimento da variedade de sorotipos de *Shigella* (West et al, 2005). (West, Sansonetti et al. 2005).

2. Shigellose:

As bactérias do gênero *Shigella* são responsáveis pela shigellose, doença popularmente conhecida por diarreia do viajante ou disenteria bacilar. Esta doença pode manifestar desde uma leve diarreia até uma severa disenteria, que se caracteriza por uma frequente passagem de fezes em pequeno volume, com sangue, muco e leucócitos fecais. (Angelini et al, 2009). Os sintomas que caracterizam a shigellose severa são: febre, náuseas, vômitos e tenesmo retal, podendo aparecer sintomas neurológicos como cefaleia e letargia (Coster et al, 1999). Há relatos de sintomas mais graves, como: hipoglicemia severa e convulsão, (Sansonetti e Egile, 1998). A disseminação da infecção pelo organismo (septicemia) é um evento raro, exceto em crianças mal nutridas (Sansonetti, 2001).

Segundo a OMS (2011), ocorrem 164.7 milhões de casos de shigellose por ano ao redor do mundo, sendo que destes, 163.2 milhões ocorrem em países em desenvolvimento e 1.5 milhão em países industrializados. No geral, 1.1 milhão de casos resultam em morte. Um total de 69% de todos os casos e 61% de todas as mortes envolvem crianças menores de 5 anos. Portanto, é considerada uma doença universal, por ser endêmica no mundo todo.

A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, onde a pobre higiene e acesso limitado à água limpa para beber promove o espalhamento de doenças entéricas. A má nutrição e a falta de intervenção médica apropriada contribuem para os altos índices de mortalidade, especialmente em crianças (Schroeder and Hilbi 2008). Em nações industrializadas, a shigellose ocorre em locais onde há dificuldade em manter a higiene apropriada (Zychlinsky, Thirumalai et al. 1996), sendo mais afetados os indivíduos em instituições de custódia, crianças em creches, viajantes para outros países e homossexuais masculinos (Wiwantkit 2006) (Niyogi 2005).

Normalmente, a shigellose desaparece em 5 a 7 dias, sendo que pessoas em bom estado nutricional e infecções leves se recuperam rapidamente e sem tratamento com antibióticos – apesar do tratamento matar as bactérias e reduzir a doença em alguns dias (CDC, 2009). Porém, em crianças desnutridas, a *Shigella* muitas vezes provoca um ciclo vicioso de nutrição ainda mais prejudicada, infecções recorrentes e posteriormente, retardo do crescimento (Niyogi 2005).

As epidemias e pandemias de disenteria severa geralmente são causadas por *S. dysenteriae*; *S. flexneri* é responsável pela shigellose pediátrica endêmica nos países em desenvolvimento; *S. boydii* é encontrada em focos endêmicos dispersos entre os países em desenvolvimento; e *S. sonnei* é a causadora da diarreia do viajante, da shigellose endêmica e surtos que ocorrem nos países desenvolvidos (Levine, 2007; Kotloff et al. 2007).

É considerada uma doença altamente infecciosa em função da baixa quantidade de inoculos necessária para iniciar uma infecção (a partir de 10 indivíduos) (DuPont et al, 1989; Kotloff et al, 1999). A forma predominante de infecção é fecal-oral e comumente, a transmissão está relacionada à comida contaminada, água ou fômites (Niyogi, 2005). A patogênese da shigellose é caracterizada pela capacidade que *Shigella* spp. possui de invadir as células epiteliais da superfície mucosa do intestino humano (Sansoneetti e Egile, 1998).

3. Patogênese celular de *Shigella* spp.:

A *Shigella* apresenta certo tropismo pelo tecido do cólon (Chamekh et al, 2008), pois os genes de virulência necessários para sua patogênese são transcritos em resposta a sinais térmicos, osmóticos e de pH que são característicos do intestino humano (Kane e Dorman, 2012). Ela consegue chegar ao seu destino após ser ingerida graças a um efetivo sistema de resistência que permite que ela sobreviva no ambiente ácido do estômago melhor do que os outros patógenos entéricos (Gorden e Small, 1993). Ao chegar ao trato intestinal, a *Shigella* é confrontada com o sistema de defesa da superfície do intestino, porém, ela possui uma estratégia de escape: alguns produtos bacterianos conseguem interferir nas vias de sinalização das células hospedeiras e regular a expressão de peptídeos antimicrobianos que são produzidos constantemente na superfície da mucosa do trato intestinal (Islam et al, 2001).

Para ganhar acesso à mucosa a *Shigella* precisa atravessar a camada epitelial, que é uma barreira física com a função de proteger o corpo da invasão de micro-organismos, comensais ou patogênicos (Sansoneetti, 2004). Elas atravessam essa barreira em um processo chamado transcitose através das células M (*membranous epithelial cells*), que são células epiteliais especializadas que tem a função de continuamente retirar amostras de

partículas do lúmen intestinal e entregá-las ao tecido linfóide subjacente, onde uma resposta imune pode ser iniciada caso seja necessário (Jennison e Verma, 2004).

Após a transcitose, a *Shigella* enfrenta outro sistema de defesa do nosso organismo: os macrófagos residentes, que tem a função de englobar e destruir todo o material que entra. Ela garante a sua sobrevivência induzindo rapidamente a morte do macrófago por apoptose, fato que é acompanhado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1beta e IL-18 e o início de uma massiva resposta inflamatória aguda (Schroeder e Hilbi, 2008).

Uma vez que o macrófago morre, a *Shigella* está livre e inicia a invasão das células epiteliais pelo lado basolateral, escapa do fagossomo e se multiplica no citoplasma. A movimentação dentro do citoplasma das células é feita através da polimerização de uma cauda de actina, semelhante a uma cauda de foguete, que propuliona a bactéria através da célula. Assim que o ciclo se completa, inicia-se outro ciclo, com a invasão de uma nova célula, desta forma, a bactéria evita a exposição aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro (Schroeder e Hilbi, 2008). Porém, o mediador intracelular Nod-1 detecta a presença dos peptídeoglicanos bacterianos e desencadeia uma cascata que resulta no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o sítio da infecção. Os PMN destroem a integridade da camada epitelial, permitindo que mais bactérias entrem na submucosa sem a necessidade de passar pelas células M (Jennison e Verma, 2004).

Portanto, a resposta imunológica desencadeada tem efeitos paradoxais, pois, ao mesmo tempo em que tenta combater a infecção, acaba atraindo mais bactérias para o local, exacerbando a infecção e a lesão do tecido. A severa destruição da camada epitelial do intestino resulta na deficiência de absorção de água, nutrientes e solutos, fatores que vão causar as características patológicas da shigellose: diarreia aquosa e aparecimento de sangue e muco nas fezes (Schroeder e Hilbi, 2008).

Ao usar a motilidade baseada em actina, a bactéria induz protrusões que invadem as células vizinhas. Depois da lise da protrusão e membrana celular, *Shigella* reinicia o seu ciclo intercelular e pode se espalhar pela monocamada celular sem nenhum passo extracelular (o que a protege da resposta imunológica do hospedeiro). Tanto a entrada na célula quanto a motilidade intracelular são exemplos de como a bactéria manipula os processos que controlam a dinâmica do

citoesqueleto da célula hospedeira. (Bourdet-Sicard et al, 2000; Heindl et al, 2010).

A *Shigella* induz a polimerização de actina no local de contato dela com a membrana da célula hospedeira, formando uma estrutura filopodial em torno da bactéria. Forma-se então uma densa rede de F-actina e vinculina (proteína de adesão focal que liga o citoesqueleto à membrana celular). Também estão envolvidas as proteínas sinalizadoras RhoGTPases, que são reguladoras essenciais dos processos celulares que envolvem reorganização do citoesqueleto; e as cortactinas, proteínas que ancoram os filamentos de actina. Toda esta estrutura desaparece quando a bactéria lisa a membrana e ganha acesso ao citosol da célula. (Bourdet-Sicard et al, 2000)

Patogênese molecular de *Shigella* spp.:

Uma série de descobertas tem permitido o progresso na compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais as *Shigella* fixam-se às células epiteliais do intestino, invadindo a seguir as mesmas; acredita-se que o processo de patogênese desta bactéria seja mediado por genes cromossômicos e plasmidiais (Sansoneetti, 2001; Sansoneetti e, Phalippon, 1999).

O genoma bacteriano apresenta sequências denominadas ilhas genômicas, que se diferenciam do resto do genoma pelo seu teor de guanina e citosina, que foram adquiridas por transferência horizontal de genes e que codificam funções acessórias, como: atividades metabólicas adicionais, resistência a antibióticos, simbiose, propriedades envolvidas no *fitness* microbiano ou patogênese, sendo que, as regiões que carregam genes que codificam para um ou mais fatores de virulência, são chamadas de PAIs, ou ilhas de patogenicidade. Foram primeiramente descritas como regiões do DNA cromossômico, mas também podem ser parte de plasmídeos ou genomas de bacteriófagos. (Hacker e Kaper 2000)

No cromossomo de *Shigella* podem ser encontrados genes que regulam a expressão dos genes de virulência plasmidiais (como o *virR*, que codifica uma molécula responsável pela expressão dependente da temperatura das proteínas *Ipa* e *Mxi-Spa*); genes importantes para a sobrevivência da bactéria no trato intestinal (como os que codificam o LPS e sideróforos); além dos genes que codificam a Shiga toxina (*Stx*) e a enterotoxina 1 (*Shet1*) (Sansoneetti, 2001; Niyogi, 2005).

S. dysenteriae é a única entre as espécies de *Shigella* a sintetizar uma poderosa citotoxina

chamada toxina de Shiga (*Stx*). (Hale, 1991). Esta toxina pertence a uma família de citotoxinas que inclui a *Stx1*, essencialmente idêntica à *Stx*; e a *Stx2* com suas variantes (*Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e* e *Stx2f*), que são antigenicamente distintas e são sintetizadas pela *E. coli* produtora de *Stx* (STEC). Em ambas as cepas, os genes que codificam *Stx* estão cromossomicamente codificados e ligados a sequências de bacteriófagos lambdóides.

Existem evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais de que ocorra a transmissão horizontal do gene *stx* por bacteriófagos (através de conversão lisogênica, a transferência de genes de fagos para bactérias) entre *Shigella*, STEC e outras *Enterobacteriaceae*. (Greco et al, 2004). A toxina de Shiga fica localizada no espaço periplasmático intermembranas das bactérias e é liberada para o meio extracelular quando estas morrem. Ela age se ligando a receptores glicolipídicos na superfície das células eucarióticas, é internalizada e inibe a síntese de proteínas, resultando na morte da célula. Sendo que as infecções com bactérias produtoras de *Stx* são associadas ao desenvolvimento da síndrome hemolítico-urêmica, uma tríade de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falência renal (Bennish et al, 2006).

Ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas são antibióticos mais frequentemente prescritos para o tratamento da doença diarreica em adultos, e estudos da infecção de STEC em modelo animal sugerem que tanto estes quanto outros antibióticos podem induzir a resposta “S.O.S.” desta bactéria, resultando na indução da conversão lisogênica e aumento da expressão de Shiga toxina (Zhang, McDaniel et al. 2000).

Porém, em estudos realizados por Bennish, et al (2005) em pacientes com disenteria causada por *S. dysenteriae* tipo I, a concentração de Shiga toxina diminui após a administração de agentes antimicrobianos eficazes e o risco de síndrome hemolítico-urêmica é baixo. Diferente do que ocorre durante a infecção por STEC, a produção de Shiga toxina por *S. dysenteriae* tipo I não é aumentada por indução da conversão lisogênica porque o bacteriófago da *Shigella* é defeituoso e incapaz de se submeter à lisogenia. No entanto, a concentração de Shiga toxina extracelular pode aumentar após a morte por antibióticos e lise das bactérias, mas a carga de toxina não parece ser proeminente. (Bennish, Khan et al. 2006).

Todos os isolados virulentos de *Shigella* carregam um plasmídeo de 220kb que codifica o “fenótipo invasivo” destas espécies. As

seqüências codificantes estão espalhadas no plasmídeo inteiro, porém, há um bloco de 30kb que demonstra uma densidade particular de genes, o locus *Ipa/mxi-spa*, considerado a região central do plasmídeo e que é necessário e suficiente para causar a entrada da *Shigella* nas células epiteliais e levar o macrófago à morte. (Sansonetti, 2001).

Como os fatores de virulência interagem com a célula hospedeira, eles precisam ser expostos na superfície bacteriana ou transportados da célula bacteriana para a célula hospedeira; e para desempenhar esta função, as bactérias desenvolveram pelo menos cinco diferentes sistemas de secreção de proteínas, entre eles, o tipo 3, encontrado em *Shigella* spp. O T3SS utilizado por *Shigella* spp. é codificado pelos genes *mxi* (membrane excretion of *Ipa*) e *spa* (surface presentation of invasion plasmid antigen), localizados em uma região de 30kb do plasmídeo de virulência (Schmidt e Hensel, 2004). O T3SS é visualizado na microscopia eletrônica como uma estrutura macromolecular na superfície da bactéria, composta por um bulbo (provavelmente citoplasmático), um “pescoço” e uma agulha que se projeta no meio extracelular. Ele forma um poro de 25 Å na membrana da célula hospedeira.

O aparato *Mxi-Spa* é observado também em outras bactérias gram-negativas e tem a função de translocar efetores bacterianos para o citosol da célula hospedeira. Desta forma, os efetores da *Shigella* podem ter acesso direto à maquinaria que governa a dinâmica do citoesqueleto (Bourdet-Sicard et al, 2000). Os sintomas de doenças infecciosas, como a peste bubônica, febre tifóide, salmonelose, shigelose e diarreia infantil, dependem em grande parte do repertório de proteínas bacterianas injetadas pelo T3SS; sendo este sistema, evolutivamente bem conservado entre diferentes patógenos bacterianos.

O *status* do T3SS é modulado pelas variações de O₂ no ambiente, que variam nos sítios específicos do trato gastrointestinal. No anaeróbio lúmen intestinal, o T3SS pode estar presente, mas não competente para a secreção. Em contraste, a relativamente aeróbia zona adjacente à superfície da mucosa, pode permitir a ativação do T3SS neste local. Esta zona de oxigenação depende do suprimento vascular, provavelmente da difusão de O₂ da rede de capilares nas pontas das microvilosidades. (Marteyn et al, 2010).

A região central do plasmídeo de virulência também inclui: a) genes que codificam proteínas efetoras como as *Ipa*: *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*, *IpaD* e *IpgD*; b) genes *IpgC* e *IpgE* que codificam chaperonas citoplasmáticas requeridas para a estabilidade de *IpaB* e *IpaC*, e *IpgD*,

respectivamente; d) o gene *virB*, que codifica uma proteína requerida para a transcrição dos genes do T3SS, para a regulação do *VirF* e de sua própria expressão; e e) genes adicionais de função desconhecida. Fora desta região, outros genes associados com a virulência são encontrados: a) *icsA* (*virG*), que codifica uma proteína de membrana responsável pela habilidade da bactéria de se mover dentro do citoplasma das células hospedeiras; b) *VirF*, que codifica um ativador transcricional que controla a expressão de *icsA* e *virB*; e c) o gene *sepA*, que codifica uma serina protease de autotransporte. Além disso, o plasmídeo de virulência contém o locus associado à invasão (*ial*), duas cópias do gene *Shet2* (que codifica a enterotoxina 2) e genes que codificam outras proteínas secretadas, como: *virA*, *IpaH4.5*, *IpaH7.8*, *IpaH9.8*; e outras ainda não caracterizadas, como: *ospB*, *ospC1*, *ospD1*, *sopE1*, *ospF* e *opsG*. (Sansonetti, 2001; Torres, 2004; Kane e Dorman, 2012).

A proteína *IpaA* tem duas funções que podem ser reguladas durante a entrada da *Shigella*: ela se liga à vinculina e este complexo *IpaA*-vinculina se associa com filamentos de actina, induzindo a despolimerização, levando a um rearranjo do citoesqueleto. Depois da lise do vacúolo, a *Shigella* monta em uma extremidade do seu corpo, uma estrutura rica em F-actina em forma de cauda de cometa para se mover intracelularmente. A própria polimerização da actina proporciona a força que direciona a bactéria através do citosol. Essa motilidade é mediada pela função da proteína *IcsA/VirG*.

A proteína *IpaB* é necessária para a regulação da secreção e pode funcionar como um sensor de célula hospedeira, sendo que deleções nesta região além de afetar a composição da “agulha”, podem levar à inabilidade de bloquear a secreção antes de receber o sinal de ativação, e conseqüentemente, afeta a habilidade de invadir células *in vitro* (Shen et al, 2010).

A proteína *IpaD* é um fator auxiliar requerido para a secreção efetiva das proteínas via *IpaB* e *IpaC*. *IpgD* é uma proteína efetora suplementar para a invasão da célula hospedeira. *VirA*, outra proteína efetora, tem a função de romper a rede de microtúbulos; e *VirB* é um ativador da transcrição de proteínas do T3SS. A proteína *IpaC* tem a função de induzir a polimerização de actina que leva à formação de estruturas filopodiais na periferia da célula (Bourdet-Sicard et al, 2000; Schroeder e Hilbi, 2008)

4. Mecanismo de indução de morte do macrófago:

Em 1997, Zychlinsky e Sansonetti publicaram um estudo propondo que a morte do macrófago induzida pela *Shigella* parece ser a chave intermediária, o link entre a infecção e a inflamação; esta morte aqui é denominada apoptose e é apresentada pelos autores como um evento pró-inflamatório resultante da ligação da proteína *IpaB* de *Shigella* à enzima ICE (que converte a forma inativa de IL-1 β em biologicamente ativa). Em 1998, Hilbi et al propuseram que *Shigella* induz a apoptose do macrófago por ativar a caspase-1 da célula hospedeira, através da ligação da proteína *IpaB*; concluindo que a apoptose induzida por *Shigella* é diferente das outras formas de apoptose (que dependem da ativação de outras caspases).

Nonaka e colaboradores (2003) realizaram ensaios com linhagens celulares macrófago-like (U937 e J774) infectadas com *Shigella* na presença de um inibidor de caspase-1; e concluíram que a caspase-1 tem efeitos apenas parciais na morte celular induzida por *Shigella* e que as caspases 3 e 7 não contribuem para esta morte. Através de ensaio pelo método TUNEL, os autores observaram a fragmentação do DNA das células infectadas sem a prévia condensação do núcleo, fenômeno que caracteriza a necrose e não a apoptose.

O mecanismo de morte pode envolver a formação de um poro na membrana plasmática das células infectadas, que é dependente dos genes de virulência *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*. Nonaka et al ainda fizeram um experimento com células U937 em diferentes estágios de diferenciação, com diferentes níveis de expressão do marcador CD11b (marcador de superfície para macrófagos); e observaram que *Shigella* pode induzir necrose em células com alta expressão de CD11b e apoptose em células com baixo nível de expressão. Estas observações sugerem que a capacidade da *Shigella* de controlar a maneira com que ela mata as células, comandando mecanismos que levam à apoptose ou necrose.

Em 2005, surge um estudo de Koterski et al, com células HMDM (macrófagos humanos derivados de monócitos) infectadas com *Shigella* virulenta, confirmando que ocorre um rompimento da membrana celular precedido de uma queda abrupta nos níveis de ATP e um rápido colapso no potencial de membrana mitocondrial. Os autores concluem que este mecanismo de morte celular é mais similar à oncosse ou necrose

do que à apoptose e ocorre na ausência da fragmentação do DNA ou condensação do núcleo.

Também em 2005, Fink e Cookson publicaram uma revisão sobre os tipos de morte celular, propondo um melhor entendimento a respeito da diversidade de processos que medeiam a morte celular. Os autores definem apoptose como um processo de demolição programada que evita elicitar a inflamação, onde ocorre a condensação do núcleo e do citoplasma e a manutenção da membrana plasmática intacta, seguida da fragmentação celular em corpos apoptóticos que são fagocitados por outras células para que seja feita a reutilização dos componentes celulares. Neste processo, as caspases 2, 8, 9 e 10 iniciam a cascata de ativação e as caspases 3, 6 e 7 são responsáveis por desmontar a célula e clivar os substratos celulares.

O processo de oncosse é acompanhado de edema celular, inchaço das organelas, bolhas e aumento da permeabilidade da membrana; e pode resultar da interferência na produção de ATP, consumo descontrolado de energia ou alterações nas concentrações de cálcio intracelular.

Já o termo necrose é utilizado para descrever a morte celular acidental resultante de perturbações no ambiente que resulta na liberação de mediadores inflamatórios; são as mudanças que ocorrem após a morte celular, independentemente dos processos. Para a morte celular induzida por *Shigella* e também *Salmonella*, os autores sugerem um novo termo: piroptose, que descreve a morte celular programada pró-inflamatória, que depende unicamente da caspase-1 e ativa as citocinas IL-1 e IL-18.

Em 2008, Shroeder e Hilbi descreveram o processo de morte do macrófago dizendo que a *Shigella* permite que o macrófago a capture e já dentro dele, secreta as proteínas *IpaB* e *IpaC* para escapar do fagossomo. A *IpaB* secretada se integra às membranas da célula de forma dependente do colesterol, iniciando a ativação proteolítica da caspase-1, que por sua vez, executa a morte celular liberando as citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-18. estas citocinas liberadas do macrófago em processo de morte elicitam a forte inflamação característica da shigellose.

Shigella no Brasil: dados epidemiológicos:

No Brasil, uma vez que a shigellose não é considerada uma doença de notificação compulsória, torna-se difícil estimar os índices de

incidência (Peirano et al, 2006). Um breve panorama pode ser apresentado com os dados das pesquisas feitas, especialmente no Norte e Nordeste do país e no Estado de São Paulo. Segundo Sergio e Leon (2009), *Shigella* está entre os micro-organismos mais frequentemente associados à diarreia em crianças, juntamente com rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Campylobacter jejuni* e *Cryptosporidium*. Como observado em outros países, no Brasil, a mortalidade por essas doenças também atinge maiores níveis nas regiões menos desenvolvidas (Sergio e Leon, 2009).

Um trabalho realizado em São Paulo (Souza et al, 2002) identificou *Shigella* como a terceira causa de diarreia em crianças (6% dos casos), sendo precedida por *Escherichia coli* (16,2% dos casos) e rotavírus (20,8% dos casos). Também em São Paulo, Andrade e colaboradores (1999) identificaram *Shigella* como segundo agente etiológico mais frequentemente isolado (12,5%) em crianças hospitalizadas com diarreia aguda que evoluíram para óbito, sendo precedida apenas por *Escherichia coli* (56,3%).

Em estudo feito no Nordeste do Brasil, foi encontrada *Shigella* em 8% dos pacientes com diarreia, rotavírus em 19,4% e *E. coli* em 23,5% (Guerrant et al, 1983). No Estado de Pernambuco, um estudo detectou *Shigella* em 4,18% de crianças aparentemente saudáveis, evidenciando o papel desempenhado pelos assintomáticos na propagação e manutenção dos agentes e processos entéricos (Leal et al, 1988). No Estado da Paraíba, *Shigella* foi isolada em 4% das crianças hospitalizadas com diarreia, sendo que esta bactéria juntamente com *E. coli* enteroinvasora (EIEC), foram os patógenos que provocaram maior proeminência de febre e sangue nas fezes (Moreno et al, 2010).

No Estado do Piauí, *S. flexneri* foi reportada como um patógeno comum encontrado em Teresina, sendo responsável por mais de 10% dos casos de diarreia aguda e detectado em crianças com até 24 meses de idade (Nunes et al, 2012). Em João Pessoa, Estado da Paraíba, *Shigella* foi responsável por 4,1% dos casos de diarreia estudados (Moreno et al, 2010). No Estado da Bahia, em estudo realizado com pacientes com diarreia severa, *Shigella* foi responsável por 54,3% dos casos (Diniz-Santos et al, 2005).

No Norte do Brasil são encontrados poucos estudos a respeito deste patógeno. No Estado do Amazonas são encontrados dois trabalhos pioneiros da década de 80, relacionados

à prevalência de enteropatógenos nas infecções diarreicas de grupos indígenas (*Shigella* foi isolada em 4% e 4,2% dos indivíduos pesquisados), em locais onde era observada a prática rotineira de utilização dos cursos de água (rios, igarapés, etc.) para o asseio corporal, lavagem de utensílios e, eventualmente, emissão dos dejetos humanos e animais (Linhares, 1992). Em estudo realizado no Estado do Pará, *Shigella* foi reportada como responsável por 13% dos casos de diarreia aguda em crianças com idade entre 0 a 5 anos (Linhares et al, 1983).

No Município de Porto Velho - Rondônia são encontrados dois estudos. Em 2001, foi relatado que o rotavírus era o patógeno mais frequente entre crianças com diarreia (19,2% dos casos) e *Shigella* estava presente em 7,7% dos casos. Porém, a presença desta última foi associada às formas mais graves da doença, onde foram observados episódios de vômitos (90%) e presença de sangue nas fezes (80% dos casos), fato que indica uma grave lesão da mucosa intestinal (Orlandi et al, 2001). Em 2006, os vírus também foram os patógenos mais frequentemente encontrados nas fezes de crianças com diarreia, incluindo 111 casos de rotavírus (23,6% dos casos de diarreia no total) e 30 casos de adenovírus (6,3%). O segundo grupo foi a *E. coli* diarreio gênica (86 casos, 18,2%), seguido por *Salmonella* sp. (44 casos, 9,3%) e *Shigella* sp. (24 casos, 5,1%) (Orlandi et al, 2006).

5. Prevenção, antibióticos e vacinas:

A recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) para prevenção da shigellose e outras doenças diarreicas é que sejam tomadas medidas para evitar o espalhamento da bactéria nas comunidades e de pessoa para pessoa. Estas medidas incluem: a) lavar as mãos com sabão e, no caso da ausência deste, esfregar as mãos com terra ou cinzas; b) assegurar a disponibilidade de água potável (proteger a fonte de água da contaminação, cloração ou fervura e armazenamento correto); c) eliminação segura dos resíduos humanos (construção de sistemas sanitários adequados para as condições de cada comunidade); d) amamentar bebês e crianças pequenas (crianças amamentadas têm menos episódios de diarreia e quanto tem, são menos severos); e) manusear e processar os alimentos com segurança; e) controle de moscas.

Em relação à terapia com antimicrobianos, a WHO (2005) recomenda que a escolha do medicamento seja feita baseada nos

dados recentes de susceptibilidade de cepas isoladas na região e caso estes dados não estejam disponíveis, devem ser observados os dados de países vizinhos e de recentes epidemias regionais. São recomendadas: ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas, pivmecillinam, ceftriaxona e azitromicina. No entanto, já é possível encontrar relatos de aparecimento de cepas resistentes à ciprofloxacina na Ásia e nos Estados Unidos (Mensa et al, 2008; Pu et al, 2009; Ye et al, 2010; Folster et al, 2011; Xia et al, 2011).

O aparecimento de cepas de *Shigella* resistentes aos antibióticos comumente utilizados é devido ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e também à transferência horizontal de genes. Os padrões de resistência são influenciados pela localização geográfica, ano em que os isolados foram obtidos, classe dos agentes antimicrobianos e a pressão exercida pelo uso destes antibióticos (Peirano et al, 2006).

Várias tentativas de criar uma vacina eficaz têm sido feitas ao longo dos anos. Sabe-se que a imunidade adquirida naturalmente contra *Shigella* é sorotipo-específica, ou seja, a infecção por um tipo de *Shigella* fornece proteção contra re-infecção pelo sorotipo homólogo, o que faz da vacinação uma opção viável para se controlar a shigellose. Inicialmente, os consumidores da vacina seriam os 20 milhões de passageiros civis e militares que visitam os países em desenvolvimento; porém, um processo de fabricação simples e econômico (como no caso das vacinas vivas) poderia tornar viável a produção local nos países em desenvolvimento. Reduzindo a necessidade de intervenção médica e o uso de antibióticos, a vacina poderia ser uma ferramenta prática de saúde pública para o controle profilático em locais onde a shigellose é endêmica. (Coster et al, 1999; Jennison e Verma, 2004).

Uma vacina apropriada para a shigellose deve cumprir certos requisitos, como: ativar o sistema imune da mucosa e essa resposta deve ser de longa duração, induzir efeitos colaterais mínimos e ser simples de administrar (Jennison e Verma, 2004). As estratégias que já demonstraram eficácia são as cepas atenuadas de *Shigella* utilizadas em vacinas orais e os polissacarídeos O ligados covalentemente a proteínas transportadoras; porém, existem outras que estão a ser estudadas mas que ainda não apresentaram evidência de proteção em humanos, como: *S. sonnei* inativada administrada via oral, proteossomos aos quais *S. flexneri* ou *S. sonnei* é adsorvida (administração intranasal), uma vacina parenteral feita com uma cepa atenuada e uma

vacina intranasal chamada Invaplex (*Shigella* invasion complex) que contém proteínas do plasmídeo de invasão (Levine et al, 2007).

Os estudos realizados até o momento presente demonstram um avanço significativo, no entanto, para alcançar completamente a proteção contra infecções por *Shigella*, o desenvolvimento de vacinas polivalentes deve ser abordado para conferir proteção contra múltiplos sorotipos (Jennison e Verma, 2004; Levine et al, 2007; WHO, 2009; Wu et al, 2011; Martinez-Becerra et al, 2012).

Em 1999, a WHO publicou um boletim no qual relatou a carga global das infecções por *Shigella* para que fossem feitas avaliações de custo-efetividade para orientar o desenvolvimento de vacinas e aplicação de estratégias de controle. Segundo este boletim, se uma vacina polivalente pudesse ser desenvolvida contra 100% dos sorotipos de *S. flexneri*, a adição de *S. sonnei* e *S. dysenteriae* tipo 1 pode fornecer proteção contra aproximadamente 79% das infecções por *Shigella* dos países em desenvolvimento e 83% dos países industrializados. Se essa vacina obtiver 70% de eficácia, até 91 milhões de infecções e 605 mil mortes poderiam ser evitadas por ano (Kotloff et al, 1999). Porém, em 2005, a WHO publicou outro documento afirmando que ainda não existem vacinas recomendadas para shigellose e, apesar de existirem várias em desenvolvimento, é improvável que sejam licenciadas antes de vários anos.

6. Identificação de cepas de *Shigella* sp.

Pode-se suspeitar da presença de espécies de *Shigella* nas culturas onde não ocorre fermentação de lactose e existe tendência à inércia bioquímica (Koneman, 2001), ou seja, são metabolicamente inativas, apresentando resultados negativos nos testes bioquímicos.

Elas são classificadas como uma espécie distinta do gênero *Escherichia* justamente por serem muito relacionadas às *E. coli*, sendo ainda mais complicada a diferenciação quando se trata da EIEC (*E. coli* enteroinvasiva) – que possui características bioquímicas de uma *E. coli*, porém, com a habilidade de causar disenteria utilizando o mesmo método das *Shigella* – sendo que ambas evoluíram do mesmo ancestral e formam um único patovar (van den Beld e Reubsæet, 2012).

No Brasil, a ANVISA (2004) recomenda que para a identificação de *Shigella* spp. sejam

utilizadas as provas bioquímicas: fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, etc.), motilidade, utilização de citrato, descarboxilação de lisina, produção de H₂S, produção de CO₂, oxidase, produção de indol e de urease, produção de fenilalanina desaminase ou triptofanase, produção de gelatinase ou DNase, utilização de aminoácidos (arginina e ornitina), hidrólise de esculina, ONPG (β-galactosidase), utilização de acetato e outras provas úteis (vermelho de metila, voges-proskauer, etc.). A ANVISA ainda recomenda que possam ser utilizados testes preparados no próprio laboratório, ou kits comerciais, métodos automatizados ou métodos rápidos cromogênicos para a detecção de enzimas.

A identificação de bactérias através da sequência de RNA 16S é bastante utilizada por ser uma região altamente conservada e fácil de amplificar, no entanto, para diferenciar espécies estritamente relacionadas como *Shigella* spp. *Escherichia coli*, vem sendo proposta a utilização do gene *gyrB* (subunidade B da DNA girase), que possui uma taxa de evolução molecular mais alta do que a do 16S (Fukushima et al, 2002; Wang et al, 2007; Wang et al, 2012).

Uma nova técnica que vem sendo utilizada para a identificação de bactérias (Bizzini e Greub, 2010; Alanio et al, 2011; Benagli et al, 2011, Sandrin et al, 2012) é a chamada MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization ou Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser), combinada com o sistema TOF (Time-Of-Flight ou Tempo de Voo), que se caracteriza de um método rápido para identificação das proteínas bacterianas por peso molecular, através da espectrometria de massas (Lay, 2001).

Em função da capacidade da *Shigella* sp. de invadir as células do epitélio intestinal, ensaios com células epiteliais in vitro são utilizados para estudo do potencial de virulência das cepas, dos fatores envolvidos na invasão celular e da relação patógeno-hospedeiro (Sansone et al, 1986, Cersini et al, 2003; Al-hasani et al, 2009; Bouzari, 2009; Bando et al, 2010; Chifiriuc, 2010; Ehsani et al, 2012, Walters et al, 2012). Ensaios in vivo com camundongos e cobaias também são utilizados para avaliar a virulência de cepas de *Shigella* sp., como o teste de Sereny (Cristea et al, 2009; Bedford et al, 2011).

ALANIO, A.; BERETTI, J.L.; DAUPHIN, B.; MELLADO, E.; QUESNE, G.; LACROIX, C.; AMARA, A.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; BOUGNOUX, M.E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, n. 5, p. 750–755, 2011.

AL-HASANI K, NAVARRO-GARCIA F, HUERTA J, SAKELLARIS H, ADLER B. The Immunogenic SigA Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Binds to HEp-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *PLoS ONE*, vol. 4, n. 12, p. 8223, 2009.

ANDRADE, J.A.B.; OLIVEIRA, J.O.T.; FAGUNDES NETO, U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarreia aguda - fatores de risco associados ao óbito. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.45, n.2, p. 121-127, 1999.

ANGELINI, M.; STEHLING, E. G.; MORETTI, M. L.; SILVEIRA, W. D. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, vol.40, n.3, p. 685-692, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf> acesso em: 20 de agosto 2011.

BANDO, S.; MORENO, A. C. R.; ALBUQUERQUE, J. A. T.; AMHAZ, J. M. K.; MOREIRA-FILHO, C. A.; MARTINEZ, M. B.. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online], vol.105, n.6, p. 786-791, 2010.

3 Referências

BEDFORD, L.; FONSEKA, S.; BOREN, T.; RANALLO, R.; SUVARNAPUNYA, A.; LEE, J.; BARNOY, S.; VENKATESAN, M.. Further characterization of *Shigella sonnei* live vaccine candidates WRSs2 and WRSs3-plasmid composition, invasion assays and Sereny reactions. *Gut Microbes* vol. 2, n. 4, p.244 – 251, 2011.

BELOIN C, DORMAN CJ: An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 47:825-838, 2003.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLIN, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*, vol. 6, n.1, p.e16424, 2011.

BENNISH, M. L.; KHAN, W. A.; BEGUM, M.; BRIDGES, E. A.; AHMED, A.; SAHA, D.; SALAM, M. A.; ACHESON, D.; RYAN, E. T.. Low risk of hemolytic uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for *Shigella dysenteriae* type 1 infection in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, n. 3, p. 356-362, 2006.

BIZZINI, A.; GREUB, G.. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, n. 11, p. 1614 –1619, 2010.

BOURDET-SICARD, R.; EGILE, C.; SANSONETTI, P. J.; NHIEU, G. T. V.. Diversion of cytoskeletal processes by *Shigella* during invasion of epithelial cells. *Microbes and Infection*, vol. 2, n. 7, p. 813–819, 2000.

BRENNER, D. J.. Family I. Enterobacteriaceae. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md, 1984, p. 408–420.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). National Antimicrobial Resistance Monitoring System annual report. Atlanta, USA: CDC; 2009.

CERSINI, A.; MARTINO, M. C.; MARTINI, I.; ROSSI, G.; BERNARDINI, M. L.. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of *Shigella flexneri* Purine Biosynthesis Mutants. *Infect. Immun*, vol. 71, n. 12, p. 7002-7013, 2003.

CHAMEKH, M.; PHALIPON, A.; QUERTAINMONT, R.; SALMON, I.; SANSONETTI, P.; ALLAOUI, A.. Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *Journal of Immunology*, vol. 15, n. 180, p. 4292-4298, 2008.

CHIFIRIUC, M. C.; BLEOTU, C.; MĂRUȚESCU, L.; CRISTEA, D.; LAZĂR, V.. The modulation of hela cells secretory patterns by invasive *Shigella* spp. and enteroinvasive *E. coli* bacterial cells and their soluble components. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, vol. 69, n. 3, p. 139-144, 2010.

COSTER, T.S.; HOGE, C.W.; VANDEVERG, L.L.; HARTMAN, A.B.; OAKS, E.V.; VENKATESAN, M.M.; COHEN, D.; ROBIN, G.; FONTAINE-THOMPSON, A.; SANSONETTI, P.J.; HALE, TL. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infection and Immunity*, vol. 67, n. 7, p. 3437-3443, 1999.

CRISTEA, D.; CECIU, S.; CHITOIU, D.T.; BLEOTU, C.; LAZĂR, V.; CHIFIRIUC, M.C. Comparative study of pathogenicity tests for *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Roum Arch Microbiol Immunol*, vol. 68, n. 1, p. 44-49, 2009.

- DINIZ-SANTOS, D.R.; SANTANA, J.S.; BARRETTO, J.R.; ANDRADE, M.G.M.; SILVA, L.R. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 9, n. 1, p. 77-83, 2005.
- DUPONT, H.L.; LEVINE, M.M.; HORNICK, R.B.; FORMAL, S.B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 159, n. 6, p. 1126-1128, 1989.
- EHSANI, S.; SANTOS, J.C.; RODRIGUES, C.D.; HENRIQUES, R.; AUDRY, L.; ZIMMER, C.; SANSONETTI, P.; TRAN VAN NHIEU, G.; ENNINGA, J. Hierarchies of Host Factor Dynamics at the Entry Site of *Shigella flexneri* during Host Cell Invasion. *Infect. Immun.*, vol. 80, n. 7, p. 2548-2557, 2012.
- FOLSTER, J.P.; PECIC, G.; BOWEN, A.; RICKERT, R.; CARATTOLI, A.; WHICHARD, J.M. Decreased Susceptibility to Ciprofloxacin among *Shigella* Isolates in the United States, 2006 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, n. 4, p. 1758-1760, 2011.
- FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic Analysis of Salmonella, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence. *Journal of clinical microbiology*, vol. 40, n. 8, p. 2779-2785, 2002.
- GORDEN, J.; SMALL, P.L. Acid Resistance in Enteric Bacteria. *Infection And Immunity*, vol. 61, n. 1, p. 364-367, 1993.
- GRECO, K.M.; MCDONOUGH, M.A.; BUTTERTON, J.R. Variation in the Shiga Toxin Region of 20th-Century Epidemic and Endemic *Shigella dysenteriae* 1 Strains. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 190, n. 2, p. 330-334, 2004.
- GUERRANT, R.L.; KIRCHHOFF, L.V.; SHIELDS, D.S.; NATIONS, M.K.; LESLIE, J.; SOUSA, M.A.; ARAUJO, J.G.; CORREIA, L.L.; SAUER, K.T.; MCCLELLAND, K.E. Prospective Study of Diarrheal Illness in Northeastern Brazil: Patterns of Disease, Nutritional Impact, Etiologies and Risk Factors. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 148, n. 6, 986-997, 1983.
- HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annual Review of Microbiology*, vol. 54, p. 641-679, 2000.
- HALE, T. L. Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. *Microbiological Reviews*, vol. 55, n. 2, p. 206-224, 1991.
- HEINDL, J.E.; SARAN, I.; YI, C.; LESSER, C.F.; GOLDBERG, M.B. Requirement for Formin-Induced Actin Polymerization during Spread of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, vol. 78, n. 1, 193-203, 2010.
- HUAN, P.T.; BASTIN, D.A.; WHITTLE, B.L.; LINDBERG, A.A.; VERMA, N.K. Molecular characterization of the genes involved in O-antigen modification, attachment, integration and excision in *Shigella flexneri* bacteriophage SfV. *Gene*, vol. 195, n. 2, p. 217-227, 1997.
- ISLAM, D.; BANDHOLTZ, L.; NILSSON, J.; WIGZELL, H.; CHRISTENSSON, B.; AGERBERTH, B.; GUDMUNDSSON, G. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nature Medicine*, vol. 7, n. 2, p. 180-185, 2001.
- JENNISON, A.V.; VERMA, N.K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *Microbiology Reviews*, vol. 28, n. 1, p. 43-58, 2004.

- KANE, K.A.; DORMAN, C.J. VirB-Mediated Positive Feedback Control of the Virulence Gene Regulatory Cascade of *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology*, vol. 194, n. 19, p. 5264-5273, 2012.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5a ed., Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1465, 2001.
- KOTERSKI, J. F., NAHVI, M., VENKATESAN, M.M.; HAIMOVICH, B. Virulent *Shigella flexneri* Causes Damage to Mitochondria and Triggers Necrosis in Infected Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infection and Immunity*, vol. 73, n. 1, p. 504-513, 2005.
- KOTLOFF, K. L., WINICKOFF, J. P.; IVANOFF, ; CLEMENS, J. D. ; SWERDLOW, D. L.; SANSONETTI, P. J.; ADAK, G. K. ; LEVINE, M. M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.
- LAY JO, JR. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev*, vol. 20, n. 2, p. 172-194, 2001.
- LEAL, N.M.; CAVALCANTI, T.I.R.; PRAZERES, D.; HOFER, E. Enteropatógenos detectados em crianças sadias em três comunidades de baixa renda, em Recife, Estado de Pernambuco, Brasil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 3, n. 2, p. 153-159, 1998.
- LEVINE, M. M., KOTLOFF, K.L.; BARRY, E.M.; PASETTI, M.F.; SZTEIN, M.B. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, p. 540-553, 2007.
- LINHARES, A.C. Epidemiologia das Infecções Diarréicas entre Populações Indígenas da Amazônia. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 8, n. 2, p. 121-128, 1992.
- LINHARES AC, MONÇÃO HC, GABBAY YB, ARAÚJO VLC, SERRUYA AC, LOUREIRO ECB. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, n. 3, p. 384-390, 1983.
- MARTEYN, B., WEST, N.P.; BROWNING, D.F.; COLE, J.A.; SHAW, J.G.; PALM, F.; MOUNIER, J.; PRÉVOST, M.C.; SANSONETTI, P.; TANG, C.M. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*, vol. 465, p. 355-360, 2010.
- MARTINEZ-BECERRA, F.J.; KISSMANN, J.M.; DIAZ-MCNAIR, J.; CHOUDHARI, S.P.; QUICK, A.M.; MELLADO-SANCHEZ, G.; CLEMENTS, J.D.; PASETTI, M.F.; PICKING, W.L. Broadly Protective *Shigella* Vaccine Based on Type III Secretion Apparatus Proteins. *Infect. Immun*, vol. 80, n. 3, p. 1222-1231, 2012.
- MENSA, L., MARCO, F.; VILA, J.; GASCON, J.; RUIZ, J. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, n. 3, p. 279-281, 2008.
- 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.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of Childhood Diarrhea in the Northeast of Brazil: Significant Emergent Diarrheal Pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 66, p. 50-57, 2010.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. *The Journal of Microbiology*, vol. 42, n. 2, p. 133-143, 2005.
- NUNES, M.R.; MAGALHÃES, P.P.; PENNA, F.J.; NUNES, J.M.; MENDES, E.N. Diarrhea associated with *Shigella* in children

and susceptibility to antimicrobials. *J Pediatr (Rio J)*, vol. 88, n. 2, 125-128, 2012.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H.P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

ORLANDI, P. P., SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; CUNHA, R.P.A.; DURLACHER, R.; SILVA, L.H.P. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 96, n. 5, p. 621-625, 2001.

PEIRANO, G., SOUZA, F.D.S.; RODRIGUES, D.D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.

PU, X.Y.; PAN, J.C.; WANG, H.Q.; ZHANG, W.; HUANG, Z.C.; GU, Y.M. Characterization of fluoroquinolone-resistant *Shigella flexneri* in Hangzhou area of China. *J. Antimicrob. Chemother.* Vol. 63, n. 5, p. 917-920, 2009.

SANDRIN, T.R.; GOLDSTEIN, J.E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* 2012 Sep 19. doi: 10.1002/mas.21359.

SANSONETTI, P.J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A.T.; MOUNIER, J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa Cells: Lysis of the Phagocytic Vacuole and Plasmid-Mediated Contact Hemolysis. *Infection and immunity*, vol. 51, n. 2, p. 461-469, 1986.

SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of

prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 25, n. 1, p. 3-14, 2001.

SANSONETTI, P. J. War and Peace at Mucosal Surfaces. *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, p. 953-964, 2004.

SANSONETTI, P. J.; EGILE, C. Molecular bases of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 74, p. 191-197, 1998.

SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. M. Cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Seminars in Immunology*, vol. 11, n. 3, p. 193-203, 1999.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, n. 1, p. 14-56, 2004.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.

SERGIO, J. V.; LEON, A.C.P. Analysis of mortality from diarrheic diseases in under-five children in Brazilian cities with more than 150.000 inhabitants. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 25, n. 5, p. 1093-1102, 2009.

SHEN, D. K.; SAURYA, S.; WAGNER, C.; NISHIOKA, H.; BLOCKER, A.J. Domains of the *Shigella flexneri* Type III Secretion System IpaB Protein Involved in Secretion. *Infection and immunity*, vol. 78, n. 12, p. 4999-5010, 2010.

SOUZA, E.C., MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B., OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal De Pediatria*, vol. 77, n. 1, p. 31-38, 2002.

- TORRES, A.G. Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 46, n3-4, p. 89-97, 2004.
- TROFA, A.F.; UENO-OLSEN, H.; OIWA, R.; YOSHIKAWA, M. Dr. Kyoshi Shiga: Discoverer of the Shiga Toxin. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 29, n. 5, p. 1303-1306, 1999.
- VAN DEN BELD, M.J.C.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiol Infect Dis.*, vol. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.
- WALTERS, L.L.; RATERMAN, E.L.; GRYS, T.E.; WELCH, R.A. Atypical *Shigella boydii* 13 encodes virulence factors seen in attaching and effacing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 328, n. 1, p. 20-25, 2012.
- WANG, L.T.; LEE, F.L.; TAI, C.J.; KASAI, H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*. Vol. 57, n. 8, 1846-1850, 2007.
- WANG, X.P.; ZHU, D.K.; WANG, M.S.; CHENG, A.C.; JIA, R.Y.; CHEN, S.; CHEN, X.Y.; TANG, T. Development and application of specific polymerase chain reaction assay targeting the *gyrB* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*. *Poult Sci*. Vol. 91, n. 10, p. 2450-2453, 2012.
- WEST, N. P., SANSONETTI, P.; MOUNIER, J.; EXLEY, R.M.; PARSOT, C.; GUADAGNINI, S.; PRÉVOST, M.C.; PROCHNICKA-CHALUFOUR, A.; DELEPIERRE, M.; TANGUY, M.; TANG, C.M. Optimization of Virulence Functions Through Glucosylation of *Shigella* LPS. *Science*, vol. 307, n. 5713, p. 1313-1317, 2005.
- WIWANITKIT, V. Sexuality Transmitted Shigellosis. *Sexuality and Disability*, vol. 24, n. 1, p. 69-71, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. 2005, disponível em: <<http://www.who.int/topics/cholera/publications/shigellosis/en/index.html>> acessado em: 22 de novembro de 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal Diseases, Initiative for Vaccine Research. 2009, disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html>, acessado em 10 de março de 2012.
- WU, T.; GRASSEL, C.; LEVINE, M.M.; BARRY, E.M. Live Attenuated *Shigella dysenteriae* Type 1 Vaccine Strains Overexpressing Shiga Toxin B Subunit. *Infect Immun*. vol. 79, n. 12, p. 4912-22, 2011.
- XIA, S.; XU, B.; HUANG, L.; ZHAO, J.Y.; RAN, L.; ZHANG, J.; CHEN, H.; PULSRIKARN, C.; PORNRUANGWONG, S.; AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R.S. Prevalence and Characterization of Human *Shigella* Infections in Henan Province, China, in 2006. *J Clin Microbiol*. vol. 49, n. 1, p. 232-42, 2011.
- YE, C.; LAN, R.; XIA, S.; ZHANG, J.; SUN, Q.; ZHANG, S.; JING, H.; WANG, L.; LI, Z.; ZHOU, Z.; ZHAO, A.; CUI, Z.; CAO, J.; JIN, D.; HUANG, L.; WANG, Y.; LUO, X.; BAI, X.; WANG, Y.; WANG, P.; XU, Q.; XU, J. Emergence of a New Multidrug-Resistant Serotype X Variant in an Epidemic Clone of *Shigella flexneri*. *J Clin Microbiol*. Vol. 48, n. 2, p. 419-426, 2010.
- ZHANG, X.; MCDANIEL, A.D.; WOLF, L.E.; KEUSCH, G.T.; WALDOR, M.K.; ACHESON, D.W. Quinolone antibiotics induce shiga toxin-encoding bacteriophages toxin production, and death in

mice. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 2, n. 181, p. 664-670, 2000.

ZYCHLINSKY, A.; THIRUMALAI, K.; ARONDEL, J.; CANTEY, J.R.; ALIPRANTIS, A.O.; SANSONETTI, P.J. In Vivo Apoptosis in *Shigella flexneri* Infections. *Infection And Immunity*, vol. 64, n. 12, p. 5357-5365, 1996.

ZYCHLINSKY, A., SANSONETTI, P. J. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? . *Trends in Microbiology*, vol. 5, n. 5, p. 201-204, 1997.