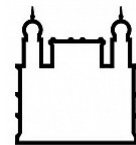




UFAM



FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

PALOMA INESSA DE SOUZA DANTAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS PRINCIPAIS FATORES DE
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Shigella flexneri***

Manaus - Am

2016

PALOMA INESSA DE SOUZA DANTAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS PRINCIPAIS FATORES DE
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Shigella flexneri***

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia pela Universidade Federal do
Amazonas do Programa Multi-institucional
de Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi

Manaus-Am

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D192v Dantas, Paloma Inessa de Souza
Variabilidade Genética dos Principais Fatores de Virulência em
Amostras Clínicas de *Shigella flexneri* / Paloma Inessa de Souza
Dantas. 2016
107 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. IpaS. 2. IpaHs. 3. Enterotoxinas. 4. Variabilidade genética. I.
Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS PRINCIPAIS FATORES DE
VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Shigella flexneri***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia como etapa obrigatória para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia para saúde.

Data de aprovação: 18 de Novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi - Presidente
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ - Amazônia**

**Dra. Najla Benevides Matos - Membro
FIOCRUZ - Rondônia**

**Prof. Dr. Luiz André Moraes Mariuba - Membro
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ - Amazônia**

DEDICATÓRIA

As mulheres da minha vida, a minha mãe por ter dedicado sua vida a mim, por fazer dos meus sonhos os seus; também dedico a você minha princesinha, que me fez conhecer o sentimento mais puro e bonito que é ser mãe, você é o motivo da minha felicidade, dedico-lhes essa conquista como prova de amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, por ser meu conforto nos momentos mais difíceis.

A minha família por tudo, esposo, filha e aos meus pais, inspirações de amor e caráter, pelo incentivo e apoio. Em especial a minha mãe por ser minha melhor amiga, por nunca me deixar desistir, por cuidar da nossa princesa nos momentos que mais precisei. Amo vocês!

À minha orientadora, Dra. Patrícia, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos, pelo apoio, incentivo e conselhos, que sem dúvida foram fundamentais para meu crescimento profissional, pela confiança depositada em mim, meu muito obrigado!

Ao Dr. Mota, pela paciência e dedicação em todos os momentos, pelo apoio e incentivo, por nos fazer acreditar que tudo é possível, por não medir esforços para que nosso projeto desse certo, pelos imensuráveis ensinamentos de biologia molecular que levarei por toda a minha vida, nunca esquecerei o que você fez por mim. Muito obrigado!

Aos amigos que fiz nessa jornada, Andréia, Mayana, Ana Paula, Elizangela, Vanda, Daniel, Fernanda, Paula Taquita, Diogo, Ruth, Samara, Nani, Marcelo, Joaquim, vocês foram a minha segunda família, obrigado pelas conversas descontraídas que me faziam esquecer todos os problemas e que sem dúvida tornou essa caminhada mais leve e feliz!

Aos professores Dr. Paulo Afonso Nogueira pela ideia do projeto e ajuda financeira, e a Dra. Tainá pela pelos conselhos valiosos em relação ao projeto.

A Paula Taquita, que sempre está disposta a ajudar, pelos conselhos e orientações que foram muito importantes nessa jornada.

Aos colegas de laboratório da Fiocruz que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para a execução do projeto.

Aos colegas de laboratório da UFAM, obrigado pela ajuda, por sempre estarem dispostos a ajudar, e por contribuírem em várias etapas para execução do projeto.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ILMD. Obrigada pela estrutura física e laboratorial.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM, por terem disponibilizado os equipamentos para o sequenciamento de minhas amostras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade do curso, obrigada pelo incentivo.

A capes pelo financiamento da bolsa no decorrer do projeto.

Dedico este trabalho a Deus, por ele ter sido o primeiro cientista a conseguir publicar os resultados sem revelar a sua metodologia.

Eduardo Tieppo

RESUMO

A *Shigella* é uma bactéria gram-negativa e intracelular, responsável pelo desencadeamento da Shigelose, uma doença diarreica caracterizada pela presença de muco e sangue. Em um estudo epidemiológico realizado por nosso grupo na cidade de Manaus-Amazonas com crianças que apresentavam diarreia severa nos anos de 2007 a 2009, o gênero *Shigella* foi o quinto patógeno mais isolado (2,2%). A partir dos dados clínicos observamos uma sintomatologia heterogênia entre os pacientes com shigelose, desde então, nosso grupo vem investigando as características genotípicas e fenotípicas desses isolados. *Shigella* é uma bactéria altamente virulenta, seus mecanismos de patogenicidade se deve a presença de genes plasmidiais e cromossomais. Entre os genes responsáveis pela sua virulência temos, os genes *Ipas* que promovem a invasão de *Shigella* nas células epiteliais e a morte dos macrófagos, os genes *IpaHs*, que modulam a resposta imunológica do hospedeiro e as enterotoxinas Shet1 e Shet2. No presente estudo, nosso principal objetivo foi verificar a variabilidade genética dos principais fatores de virulência em amostras clínicas de *Shigella flexneri*. Os genes de virulência foram amplificados com iniciadores específicos desenvolvidos no estudo, os amplicons obtidos foram sequenciados e analisados. Os genes *Ipa*, *IpaH*, *Set1A*, *Se1B* e *Sen* foram amplificados com sucesso. Um total de 474 sequências referentes aos 19 genes de virulência de *Shigella* foi sequenciado, no entanto, apenas 12 genes, num total de 154 sequências foram analisadas quanto à presença de polimorfismo. Neste estudo foram identificadas 9 mutações de ponto em 5 genes de virulência de *Shigella*, sendo eles, o gene *IpaD*, *SenA*, *IpaH3*, *IpaH2.5* e *IpaH6*. O estudo da identificação de determinantes genéticos específicos é essencial para compreender o mecanismo de patogênese e a propagação de variantes virulentas na população de *Shigella*. Nosso trabalho se baseia em estudos anteriores realizados por nosso grupo, uma vez que a amplificação inicial dos genes de virulência desses isolados foi ineficaz. Apesar de poucos genes serem analisados, variações de nucleotídeos foram encontradas em isolados diferentes, que podem interferir na expressão do fenótipo de virulência. Um novo sequenciamento será necessário para confirmar as variações encontradas no estudo, assim como estudos *in vitro* e *in vivo*, para verificar se essas alterações podem interferir no fenótipo de virulência das amostras clínicas de *Shigella*.

Palavras-chaves: *Ipas*. *IpaHs*. Enterotoxinas. Variabilidade genética.

ABSTRACT

Shigella is a gram-negative and intracellular bacterium responsible for triggering Shigellosis, a diarrheal disease characterized by the presence of mucus and blood. . In an epidemiological study conducted by our group in the city of Manaus-Amazonas with children with severe diarrhea from 2007 to 2009, the genus *Shigella* was the fifth most isolated pathogen (2.2%). Based on the clinical data we observed a heterogenous symptomatology among patients with shigellosis, since then, our group has been investigating the genotypic and phenotypic characteristics of these isolates. *Shigella* is a highly virulent bacterium, its mechanisms of pathogenesis is due to the presence of plasmidial and chromosomal genes. Among the genes responsible for its virulence are the *Ipas* genes that promote the invasion of *Shigella* in epithelial cells and the death of macrophages, the *IpaHs* genes, which modulate the host's immune response and the enterotoxins Shet1 and Shet2. In the present study, our main objective was to verify the genetic variability of the main virulence factors in clinical samples of *Shigella flexneri*. The virulence genes were amplified with specific primers developed in the study, the obtained amplicons were sequenced and analyzed. The *Ipa*, *IpaH*, *Set1A*, *Se1B* and *Sen* genes were successfully amplified. A total of 474 sequences referring to the 19 virulence genes of *Shigella* were sequenced, however, only 12 genes, a total of 154 sequences were analyzed for the presence of polymorphism. In this study 9 point mutations were identified in 5 *Shigella* virulence genes, being the *IpaD*, *SenA*, *IpaH3*, *IpaH2.5* and *IpaH6* gene. The study of the identification of specific genetic determinants is essential to understand the mechanism of pathogenesis and the propagation of virulent variants in the population of *Shigella*. Our work is based on previous studies conducted by our group, since the initial amplification of the virulence genes of these isolates was ineffective. Although few genes are analyzed, nucleotide variations have been found in different isolates, which may or may not interfere in the expression of the virulence phenotype. A new sequencing will be required to confirm the variations found in the study, as well as in vitro and in vivo studies, to verify if these changes may interfere with the virulence phenotype of the *Shigella* clinical samples.

Keywords: *Ipas*. *IpaHs*. Enterotoxins. Genetic variability

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - “*Basic Local Alignment Search Tool*”
Células M - *microfold cells*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos
EDTA - “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”
E1 – enzima ativadora da ubiquitina
E2 – enzima de conjugação
E3 – Ubiquitina ligase
GEMS – Estudo Multicêntrico Entérico Global
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
IL - Interleucina
Ipas - antígenos de invasão do plasmídeo
IpaH – Família multigênica *IpaH*
IS – Sequências de inserção
kDa – massa molecular da proteína expresso em *daltons* (Da)
LPS – Lipopolissacarídeo
Mix - *membrane excretion of Ipa*
mL - Mililitro
mM – Milimolar
M - Molar
NCBI - “*National Center for Biotechnology Information*”
N-Glu – N-acetilglucosamina
NF-κB – Fator Nuclear Kappa B
Nod – Receptor com domínio de ligação nucleotídico
ORFs – Fases abertas de leitura
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAI – Ilha de Patogenicidade
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PKC – Proteína quinase C
PMN – Leucócitos polimorfonucleados
RNase - Ribonuclease

RhoGTPases – família de enzimas hidrolases de papel regulatório

Rha – Rhamnose

SDS – Dodecil sulfato de sódio

spa - *surface presentation of invasion plasmid antigen*

Shet – Enterotoxina de *Shigella*

TBE – TRIS-EDTA-BORATO

Toll – Receptores do tipo Toll (TLR)

TRAF2 – Fator 2 associado ao receptor TNF

T3SS – Sistema de secreção do tipo 3

UFC – Unidade formadora de colônia

UPEC - *Escherichia coli* urupatogênica

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

μL – Microlitro

μM – Micromolar

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Resumo dos efetores <i>IpaHs</i> de <i>Shigella</i>	37
Tabela 2: Função dos efetores e localização dos genes que utilizados no estudo.	42
Tabela 3: Descrição das amostras selecionadas para o estudo	46
Tabela 4: Lista dos genes cromossomais e iniciadores que foram desenvolvidos para o estudo.....	52
Tabela 5: Lista dos genes plasmidiais e iniciadores que foram desenvolvidos para o estudo.	52
Tabela 6: Presença e ausência dos genes de virulência nas cepas clínicas de <i>Shigella</i> spp. ...	59
Tabela 7: Descrição do total dos fragmentos sequenciados de cada gene, resultado e esquemas das regiões analisadas de cada um.	62
Tabela 8: Sequências de baixa qualidade e seus respectivos genes	63
Tabela 9: Resultado da análise no programa BLATN.....	64
Tabela 10: Características das mutações encontradas no estudo.....	69
Tabela 11: Identificação das mutações nas sequências dos genes de virulência em suas respectivas cepas clínicas.	69
Tabela 12: Sintomatologia clínica relacionada às amostras de <i>Shigella</i> spp.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do antígeno-O.	19
Figura 2: <i>Shigella</i> e as células M	24
Figura 3: O complexo formado pela proteína <i>IcsA</i> da <i>S. flexneri</i>	25
Figura 4: Mecanismos da patogênese de <i>Shigella</i> no epitélio intestinal.	26
Figura 5: Mapa genético comparativo dos plasmídeos de virulência de <i>Shigella</i> spp.....	28
Figura 6: Ilha de patogenicidade de <i>Shigella</i>	29
Figura 7: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III (T3SS) de <i>Shigella flexneri</i>	30
Figura 8: Expressão de proteínas efetoras dependente, parcialmente dependente ou não dependente da atividade do T3SS.....	31
Figura 9: Representação esquemática da estrutura da família de proteínas <i>IpaH</i> presentes no cromossomo.....	33
Figura 10: Proteínas <i>IpaH</i> tem alvos específicos para ubiquitinação na célula epitelial	35
Figura 11: Morte do macrófago por piroptose..	36
Figura 12: Sítios de ligação para vinculina (VBSs).	38
Figura 13: Esquema da estrutura secundária e regiões funcionais do efetor <i>IpaB</i>	39
Figura 14: Morte do macrófago por piroptose.	40
Figura 15: Esquema do sistema de secreção T3SS e seus translocadores.....	41
Figura 16: Esquema das regiões intergênicas e da ORF do gene de virulência.....	45
Figura 17: Fluxograma da análise <i>in silico</i> das sequências de nucleotídeo	49
Figura 18: Quadro da análise dos iniciadores no programa Oligo Analyser.	51
Figura 19: Gel 1% da extração do DNA total e da amplificação do gene 16S..	53
Figura 20: Quadro das Concentrações dos reagentes da PCR utilizados para amplificação dos genes	54
Figura 21: Amplicons das padronizações dos iniciadores com a cepa padrão de <i>Shigella</i>	55
Figura 22: Imagens da amplificação dos genes <i>Ipas</i>	56
Figura 23: Imagens das amplificações da família multigênica <i>IpaH</i>	57
Figura 24: Imagens das amplificações da família multigênica <i>IpaH</i> do plasmídeo. Géis á 1% corado com brometo de etídeo.....	58
Figura 25: Imagens das amplificações dos genes que codificam para as enterotoxinas <i>Shet1 e Shet2</i>	58
Figura 26: Representação esquemática da análise das sequências dos genes de virulência. ..	60

Figura 27: Alinhamento das sequências de nucleotídeo no programa BioEdit.....	65
Figura 28: Alinhamento das sequências de nucleotídeo do gene <i>IpaH2.5</i>	66
Figura 29: Análise da sequência do gene <i>IpaD</i>	67
Figura 30: Identificação das mutações na estrutura do <i>IpaD</i>	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 SHIGELLA SPP.	18
1.2 EPIDEMIOLOGIA	19
1.2.1 Epidemiologia no Brasil	20
1.3 SHIGELOSE	22
1.3.1 Mecanismo de invasão	23
1.3 SHIGELLA SPP.: MECANISMO MOLECULAR	27
1.4.1 Plasmídeo	27
1.4.2 Genes Cromossomais	31
1.4.3 Fatores de virulência	32
1.4.3.1 Enterotoxinas Shet1 e She2	32
1.4.3.2 Genes <i>IpaHs</i>	33
1.4.3.3 Genes <i>Ipas</i>	37
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVO GERAL	44
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> : SELEÇÃO DOS GENES E DESENHO DOS INICIADORES: ..	45
4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS	46
4.3 REATIVAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE SHIGELLA.....	47
4.4 CARACTERIZAÇÕES DOS GENES DE VIRULÊNCIA	47
4.5 SEQUENCIAMENTO	48
5. RESULTADOS	50
5.1 ELABORAÇÕES E ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DOS INICIADORES.....	50
5.2 SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES	52
5.3 AMOSTRAS BACTERIANAS	52
5.4 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	53
5.5 PADRONIZAÇÕES DOS INICIADORES.....	54
5.6 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	56
5.7 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO	60
5.8 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	64

6 DISCUSSÃO	71
6.1 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>SHIGELLA SPP.</i>	71
6.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	73
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO 1.....	86
ANEXO 2 – SEQUÊNCIAS DOS GENES QUE FORAM ANALISADOS.....	88

INTRODUÇÃO

A falta de saneamento básico favorece a disseminação de doenças entéricas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, sendo um importante problema de saúde pública no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (BEYENE; TASEW, 2014; SCHROEDER; HILBI, 2008).

Entre os agentes patogênicos relacionados às doenças entéricas, *Shigella* spp., agente etiológico da disenteria bacilar ou shigelose, foi e continua sendo um grande desafio para a medicina (BEYENE; TASEW, 2014).

Bactérias do gênero *Shigella* pertencem à família enterobacteriaceae, são bacilos gram-negativos, não esporulados, imóveis e anaeróbios facultativos (SCHROEDER; HILBI, 2008). O gênero compreende quatro espécies: *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. Sonnei*, que são classificadas de acordo com o antígeno de superfície presente na membrana celular. (SCHROEDER; HILBI, 2008). *Shigella* é uma bactéria altamente patogênica, podendo desenvolver a doença mesmo com um inóculo mínimo de 10 a 100 UFC (LIMA; HAVT; LIMA, 2015).

Shigelose está entre as principais causas de doenças diarreicas em crianças menores de 5 anos e tem uma influência significativa na morbidade e mortalidade de crianças com diarreia (BEYENE; TASEW, 2014).

A disenteria bacilar causa destruição aguda da mucosa intestinal, produzindo muco e fezes sanguinolentas. Seus sintomas podem evoluir de uma leve diarreia aquosa para sintomas mais graves como febre, cólicas abdominais, fezes com muco e sangue, podendo se tornar fatal se não for tratada adequadamente (SCHROEDER; HILBI, 2008).

Bactérias do gênero *Shigella*, quando em contato com as células epiteliais, sintetizam fatores de virulência que são responsáveis pela invasão, propagação, morte dos macrófagos e conseqüentemente pelo desenvolvimento da doença e seus sintomas característicos. Seu potencial fenotípico invasivo é conseqüência de um grande plasmídeo de virulência ou plasmídeo *inv*, cuja estrutura apresenta um *operon* que codifica para o sistema de secreção do tipo III (T3SS), responsável pela entrada da bactéria e injeção de proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira (CRUZ et al., 2014).

O locus *Ipa/mix/spa* presente no plasmídeo *inv*, concentra grande parte dos genes envolvidos na virulência de *Shigella* e que codificam para proteínas altamente conservadas, como as invasinas *Ipas* (*IpaA*, *B*, *C* e *D*). Essas invasinas compõem o sistema de secreção

T3SS, e regulam a liberação das proteínas efetoras no espaço intracelular, através do canal secretório. Já os genes *IpaH*, codificam enzimas da família Ubiquitina ligase E3, enzimas que possuem um importante papel na modulação da resposta do hospedeiro interferindo no processo inflamatório. *Shigella* tem doze efetores IpaH no seu genoma, cinco no plasmídeo de virulência e sete em seu cromossomo (ASHIDA; NAKANO; SASAKAWA, 2013).

Além desses genes envolvidos na patogenicidade de *Shigella*, podemos citar duas enterotoxinas que também estão envolvidas na atenuação da resposta inflamatória, denominadas *Shigella* enterotoxina 1 (SHET1) cujo gene está no cromossomo e *Shigella* enterotoxina 2 (SHET 2) codificada pelo gene *sen/ospD3*, presente no plasmídeo (CRUZ et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos na patogenicidade de *Shigella* há décadas vêm sendo investigados, alguns com funções estabelecidas e bem caracterizadas, porém estudos que relacionem os genes de virulência de *Shigella* com os sintomas da doença em humanos ainda são bastante escassos (CRUZ et al., 2014; LIMA et al., 2015).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Shigella* spp.

Shigella é um patógeno entérico que pertence à família Enterobacteriaceae, seus mecanismos de patogênese e sua interação patógeno-hospedeiro a torna única, fato que tem motivado inúmeros estudos nas últimas quatro décadas os quais, em suma, buscam elucidar os mecanismos da infecção celular o que tem contribuído enormemente para a compreensão da patogênese bacteriana (KILLACKY; SORBARA; GIRARDIN, 2016a; THE et al., 2016).

Shigella spp. são bactérias gram-negativas, não-móveis, altamente patogênicas, visto que necessita de uma pequena dose infectante de células (<10) para desencadear uma infecção sintomática, quando em comparação com outras bactérias entéricas cujas doses infecciosas são quatro vezes maiores (THE et al., 2016; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014).

Bactérias do gênero *Shigella* são agentes etiológicos da disenteria bacilar ou Shigelose. A primeira espécie foi descrita no ano de 1897, designada como *Shigella dysenteriae* em homenagem ao cientista japonês Kiyoshi Shiga que a descobriu durante uma epidemia no Japão. Algum tempo depois da descoberta, outros pesquisadores isolaram o mesmo patógeno, mas foram necessários aproximadamente 40 anos para outras espécies desse gênero serem descritas: *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* (BAKER et al., 2014; NICOLAS; GRANIER; LE GUEN, 2007).

O gênero *Shigella* compreende quatro espécies ou sorogrupos, designados como *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. Boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D). *Shigella* spp. possui cerca de 50 sorotipos e subсоротипos divididos em *S. flexneri* (15 sorotipos e subсоротипos, entre elas *Shigella flexneri* 1a, 1b, 2a, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6, X e Y, além de mais dois sorotipos novos 7A e 7B), *S. dysenteriae* (15 sorotipos), *S. boydii* (19 sorotipos) e *S. sonnei* (sorotipo 1) (LIVIO et al., 2014).

Os sorogrupos são diferenciados de acordo com o antígeno de superfície (antígeno O), componente do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da parede celular da bactéria (PEREPELOV et al., 2012; SCHROEDER; HILBI, 2008).

O LPS de *Shigella* consiste em três estruturas, um domínio hidrofóbico conhecido como **lipídeo A** (ou endotoxina), a **parte central** e o **polissacarídeo distal** (antígeno-O). O lipídeo A está relacionado com a sobrevivência da bactéria, o parte central é um grande oligossarídeo que liga o antígeno-O a estrutura do lipídeo A. O antígeno-O consiste em uma

repetição de 3 ramnosas (Rha), uma N-acetilglucosamina (N-Glu) e um tetrassacarídeo (Fig. 1) (KNIREL et al., 2015; MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012).

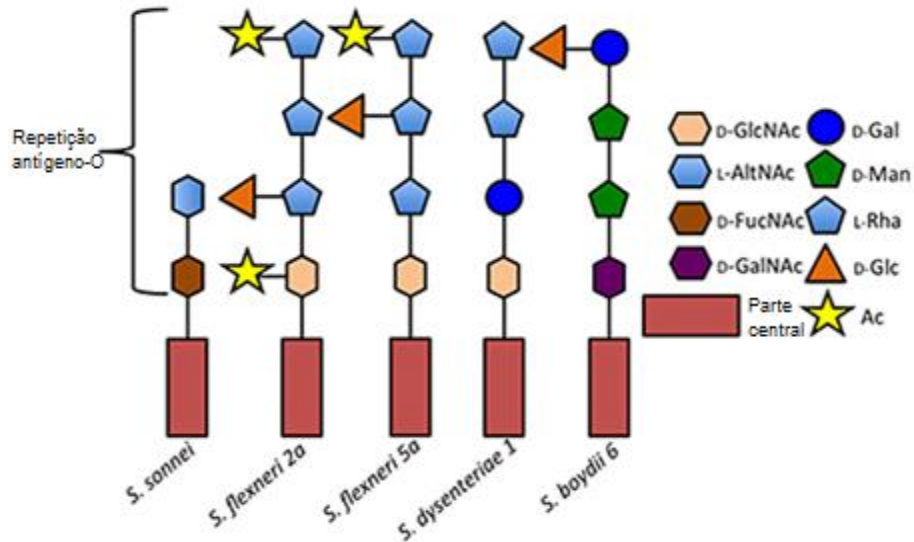


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do antígeno-O. Legenda: 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose (D-GlcNAc); 2-acetamido-2-desoxi-L-ácido altruronic (L-AltNAc); 2-acetamido-4-amino-2, 4-didesoxi-D-fucose (D-FucNAc); 2-acetamido-2-desoxi-D-ácido galacturônico (D-GalNAc), D-galactopiranosose (D-Gal); D-manose (D-Man); L-ramnose (L-Rha); D-glucose (D-Glc); O-acetil (Ac); Oligossacarídeo que liga o antígeno-O ao lipídeo A (parte central). Fonte: Adaptado de Andreson et al., (2016).

O LPS atua como um dos principais indutores da resposta imune inata, seu reconhecimento leva a expressão de genes pró-inflamatórios e seu tetrassacarídeo, antígeno-O, está envolvido com a resistência de *Shigella* (MARTEYN et al., 2012)

A sorotipagem por aglutinação com anti-soro específico, ainda é o método mais utilizado para identificação de espécies de *Shigella*, porém a reatividade cruzada com algumas cepas de *Escherichia coli* pode prejudicar ou alterar o resultado, assim como aspectos técnicos de sorotipagem e a grande variedade de sorotipos de *Shigella* torna essa ferramenta menos acessível em comparação as técnicas moleculares (SAHL et al., 2015).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Bactérias do gênero *Shigella* estão entre os mais importantes patógenos causadores de diarreia. Shigelose é uma doença global e endêmica em todo o mundo. Estudos recentes mostram que o sorogrupo de maior prevalência em países em desenvolvimento é o da *Shigella flexneri* (60%), seguido de *S. sonnei* (15%), *S. dysenteriae* e *S. boydii* na mesma frequência (6%). Porém em países desenvolvidos o sorogrupo de maior prevalência segundo a literatura é

o da *S. sonnei* (77%), seguido de *S. flexneri* (16%), *S. boydii* (2%) e *S. dysenteriae*. Outro aspecto importante é a distribuição de diferentes sorotipos de *Shigella* em algumas cidades de um mesmo país, onde as condições socioeconômicas são diferentes (LIMA; HAVT; LIMA, 2015). Essa distribuição geográfica também pode variar sazonalmente devido às diferenças de idade e mudanças nas cepas (NICOLAS; GRANIER; LE GUEN, 2007).

Em um estudo multicêntrico entérico global (GEMS) sobre a etiologia de diarreia moderada e grave realizado durante três anos em 4 locais na África subsaariana (Gambia; Mali; Kenya; Moçambique) e 3 no sul da Ásia (Paquistão; Índia; Bangladesh), colocou *Shigella* entre os 4 principais patógenos causadores de diarreia (KOTLOFF et al., 2013).

Livio e colaboradores (2014) realizaram outro estudo multicêntrico entérico global para investigar a prevalência e etiologia em crianças com diarreia moderada ou grave com idade menores de 5 anos em 4 locais da África e 3 da Ásia. *Shigella* figurou entre as 4 espécies mais prevalentes; foram analisados 1130 isolados de *Shigella* sendo estes classificados como: *S. flexneri* (n=745; 65,9% sendo que os sorotipos mais frequentes foram o 2a, 3a, 6, 2b, 1b), *S. sonnei* (n=268; 23,7%), *S. boydii* (n=61; 5,4%) e *S. dysenteriae* (n=56; 5%).

Em um estudo para verificar a prevalência de enteropatógenos em crianças com diarreia em um centro de saúde no sudoeste da Etiópia, de 260 crianças com diarreia, 129 foram positivas para as parasitoses intestinais, dentre as infecções bacterianas, *Salmonella* e *Shigella* tiveram frequência de 16 (6,2%) e 6 (2,3%) isolados respectivamente (BEYENE; TASEW, 2014).

Em um estudo realizado durante 16 anos em Beijing (1994 a 2010), sobre a distribuição de espécies de *Shigella*, foram isoladas 5999 cepas, com maior pico relatado no ano de 1996 (n=1.194), e constante diminuição a partir desse ano, chegando a 22 casos em 2008. A espécie com maior prevalência foi a *Shigella flexneri* com 71% (n=4295), sendo este o grupo dominante por 12 anos consecutivos (MAO et al., 2013). Zhang et al. (2014) realizaram um estudo durante dois anos no distrito de Xiaoshan-China, para avaliar o perfil de resistência e genes de virulência. Foram analisados 356 isolados de *Shigella*, e a espécie predominante foi a *S. sonnei* (n=244/ 68,5%), seguida por *S. flexneri* (n=112/31,5%).

1.2.1 Epidemiologia no Brasil

No Brasil as espécies de *Shigella* frequentemente encontradas são *Shigella flexneri* seguida de *Shigella sonnei* (ANGELINI et al., 2009; LIMA; HAVT; LIMA, 2015), com prevalência de 8 a 10% em crianças menores de um ano de idade e de 15 a 18% em crianças

entre 2 a 5 anos de idade (BASTOS; LOUREIRO; HOFER, 2012). A presença de *S. flexneri* está associada a saneamento básico, e *S. sonnei* está relacionado a eventos esporádicos e surtos de disenteria por alimentos contaminados (BASTOS; LOUREIRO, 2011).

Em um estudo realizado em Ribeirão Preto-SP para o levantamento da frequência de enteropatógenos causadores de diarreia em crianças por um período de 4 anos (1994-1997), *Shigella* spp. foi o segundo gênero mais frequente (6,2%), atrás apenas da *Escherichia coli* enteropatogênica, com 8,7% dos casos (MEDEIROS et al., 2001). Souza et al. (2013) avaliaram a prevalência de *Shigella* em um Hospital infantil de Belo Horizonte, de 157 amostras coletadas de fezes de crianças com diarreia, 17 (10,8%) foram positivas para *Shigella*, porém o sorogrupo com maior frequência foi *S. sonnei* com 15(88,2%) dos casos, contrariando outros estudos realizados no Brasil, que relatam *S. flexneri* a espécie com maior frequência nos casos de Shigelose.

Em um estudo realizado em Salvador com fezes de crianças com diarreia, foram analisadas 260 amostras, sendo que 114 (54,3%) foram identificadas como *Shigella* spp. (DINIZ-SANTOS et al., 2005). Nunes e colaboradores (2012) verificaram a distribuição de *Shigella* isoladas de crianças com diarreia aguda em Teresina entre 2004 a 2007, e detectaram apenas 26/250 (10,4%) crianças com Shigelose, sendo 21 crianças infectadas por *S. flexneri* (80,8%), a mais prevalente, seguida de *S. sonnei* (5 crianças, 19,2%).

Bastos e colaboradores (2012), em um estudo avaliando a frequência de sorogrupo de espécies de *Shigella* no estado do Pará, analisaram 122 amostras de pacientes com diarreia aguda entre 1979-2009, a prevalência foi da espécie *S. flexneri* 81 (66,4%) seguido de *S. sonnei* 40 (32,8%) e *S. Boydii* 1 (0,81%).

Orlandi e colaboradores (2006), estudando a etiologia de doenças diarreinogênicas em um hospital de Porto velho com crianças menores de 5 anos, mostraram que 5,1% dos casos tinham *Shigella* como o agente etiológico, sendo *Shigella flexneri* (72%) o sorogrupo com maior frequência. Silva e colaboradores (2008) verificaram a incidência de *Shigella* spp. em um hospital público de Rondônia, e dos 25 isolados pertencentes ao gênero *Shigella*, 18 foram identificados como *S. flexneri*, 3 como *S. sonnei*, 3 como *S. boydii* e apenas 1 como *S. dysenteriae*.

Em um estudo etiológico realizado em Manaus, no período de 2007 a 2008, foram coletadas 1339 amostras de fezes de crianças com diarreia com idade variando entre 0 a 10 anos que procuravam atendimento médico em hospitais públicos da cidade. No estudo cerca de trinta isolados foram confirmados para o gênero *Shigella*, sendo *Shigella flexneri* a

espécie mais frequente com 60% dos isolados, seguida de *S. sonnei* com 22,2%, *S. dysenteriae* e *S. boydii* ambos com 6,6% (CRUZ et al., 2014).

1.3 SHIGELOSE

A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve a shigelose como um dos principais problemas de saúde pública, especialmente onde há saneamento básico inadequado, abastecimento e tratamento de água inapropriados (BASTOS; LOUREIRO; HOFER, 2012; OJHA et al., 2013). Acomete principalmente crianças menores de 5 anos, sendo responsável pelas principais causas de morbidade e mortalidade infantil, principalmente onde o índice de desenvolvimento humano (IDH) é baixo (ANGELINI et al., 2009; TANEJA et al., 2012; UDDIN et al., 2013).

Shigelose é uma infecção invasiva do colón e reto humano que causa inflamação aguda da mucosa. A doença apresenta um amplo espectro de sintomas que podem variar de acordo com a espécie, idade e resistência imunológica do hospedeiro (NICOLAS; GRANIER; LE GUEN, 2007; PROSEDA et al., 2012; SANGEETHA et al., 2014). Os sintomas clínicos variados entre pacientes com shigelose estão relacionados com a expressão de diversos genes de virulência durante a infecção, o que caracteriza um perfil genético diversificado desse patógeno (SANGEETHA et al., 2014).

A contaminação ocorre via fecal-oral, de pessoa a pessoa, por alimentos contaminados, água contaminada, lugares com superlotação de pessoas, devido sua baixa dose infecciosa, e já foram relatados casos em que moscas foram os vetores (OJHA et al., 2013). Casos de complicações sistêmicas por shigelose são raros, no entanto, já foram detectadas bacteremias em alguns pacientes com HIV e em crianças desnutridas, assim como associação do gênero com sintomas crônicos como artrite, constipação funcional e doença do refluxo gastroesofágico (APPANNANAVAR et al., 2014; LIMA; HAVT; LIMA, 2015).

Na contaminação oral, *Shigella* passa pelo estômago, chega ao intestino delgado onde inicia a invasão da mucosa do colón. Esse processo desencadeia o aparecimento dos sintomas clínicos da doença: febre, cólicas intestinais, emissão mucopurulenta, fezes com sangue, inflamação, destruição dos tecidos e ulceração (CARAYOL; TRAN VAN NHIEU, 2013; PHALIPON; SANSONETTI, 2007; SANSONETTI, 2001).

O período de incubação varia de 1 a 4 dias, sendo que a doença dura cerca de 5 a 7 dias, podendo se estender até 8 dias com *S. dysenteriae*. A diarreia aquosa geralmente ocorre

48 horas após a infecção, sintoma relacionado com a expressão de enterotoxinas (DEKKER; FRANK, 2015; FAHERTY et al., 2012).

A prevenção de shigelose ocorre basicamente por boas práticas higiênicas, como lavar as mãos, pois nenhuma vacina está disponível no mercado (NICOLAS; GRANIER; LE GUEN, 2007).

Espécies de *Shigella* em geral são organismos frágeis no ambiente externo, quando liberados nas fezes morrem rapidamente devido a sua acidez. Com isso métodos microbiológicos de rotina, além de consumirem muito tempo, muitas vezes são ineficientes no processo de detecção e identificação desses patógenos. Em contrapartida, técnicas de biologia molecular independentes de cultivo, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico de *Shigella* e têm se mostrado uma alternativa viável à bacteriologia clássica e também muito eficiente (OJHA et al., 2013).

Em laboratório de análises clínicas, *Shigella* é identificada por testes bioquímicos como o teste de motilidade e de fermentação a lactose, porém muitas vezes esses testes não conseguem diferenciá-la de algumas cepas de *E. coli*. (SAHL et al., 2015).

1.3.1 Mecanismo de invasão

A invasão do epitélio intestinal é bem complexa, pois o mesmo atua como uma barreira física contra patógenos encontrados no lúmen intestinal (ANDERSON; SANSONETTI; MARTEYN, 2016). Após a contaminação oral, *Shigella* chega ao estômago e encontra um pH ácido (1-2), porém, a mesma expressa genes responsáveis pela sua resistência ao ácido gástrico. Dentre esses genes podemos citar: o gene *RpoS* que codifica o fator de transcrição (sigma σ), conhecido como sistema ácido-resistência 1 (AR1), que permite que *Shigella* spp. vivam em um pH abaixo de 2,5, e o sistema ácido-resistência 2 (AR2), codificado pelos genes *gadA* e *gadB*, um sistema de resistência a ácidos dependentes de glutamato, que protege as células em pH inferior a 3 (CHENG et al., 2007; JENNISON; VERMA, 2007).

Ao chegar ao intestino, *Shigella* detecta a temperatura de 37°C, fator que indica o local correto para iniciar a infecção, promovendo a transcrição de genes metabólicos que favorecem a sua sobrevivência e disseminação (ANDERSON; SANSONETTI; MARTEYN, 2016; LIMA; HAVT; LIMA, 2015).

Ao atingir o cólon, o processo de infecção começa com a translocação (transcitose) de *Shigella* através das células M (*microfold cells*) (Fig. 2) (THE et al., 2016). As células M

reconhecem e transportam antígenos presentes no lúmen intestinal para uma bolsa presente na parte basolateral de sua célula, onde contém linfócitos, células dendríticas e macrófagos que reconhecem esses antígenos e desencadeiam a resposta imune inata do hospedeiro (JENNISON; VERMA, 2004; RANALLO et al., 2010). Vários patógenos entéricos incluindo *Shigella* utilizam as células M como porta de entrada para o epitélio de revestimento gastrointestinal, onde se desenvolvem e causam infecção (PARSOT, 2005).

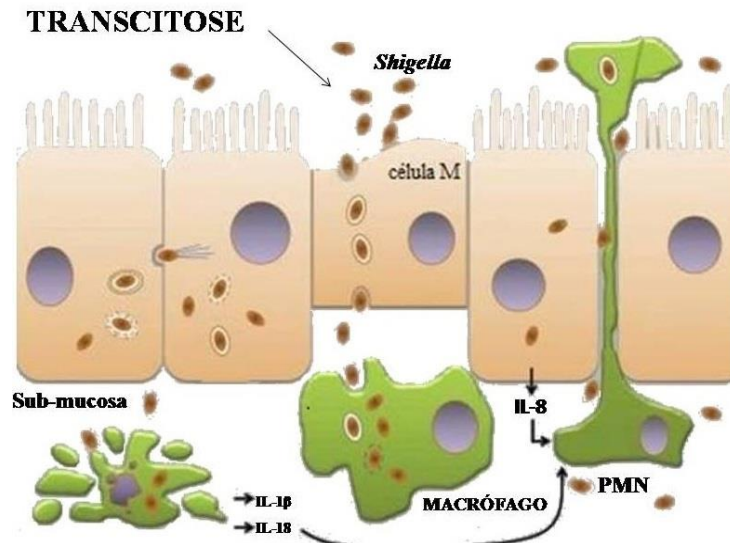


Figura 2. *Shigella* e as células M. A infecção de *Shigella* começa com a translocação (transcitose) através das células M, que são células epiteliais especializadas (CE) presentes no epitélio intestinal. As células M apresentam um papel importantíssimo na resposta imunológica do hospedeiro, pois reconhecem e transportam antígenos presentes no lúmen intestinal para uma bolsa presente na parte basolateral de sua própria célula, onde contém macrófagos que reconhecem esses antígenos e desencadeiam a resposta imune da mucosa. Fonte: Adaptado de Yang et al., (2015).

Após a translocação, *Shigella* chega ao tecido linfóide onde é fagocitada por macrófagos e células dendríticas. No entanto, *Shigella* destrói o vacúolo fagocítico e se liberta para o citoplasma. No citoplasma do macrófago a bactéria libera efetores que interferem nas vias de sinalização e ativam a morte programada da célula. A morte do macrófago causa a liberação de grandes quantidades de citocinas IL-1β e IL-18, que iniciam o processo inflamatório e recrutam células polimorfonucleadas (PMN) para o local da infecção que perturbam e destroem a integridade do epitélio intestinal facilitando a translocação da *Shigella* do lúmen para a submucosa gastrointestinal (ASHIDA; KIM; SASAKAWA, 2014; ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015).

As bactérias que escapam do macrófago têm acesso à parte basolateral das células epiteliais e desencadeiam a montagem de uma estrutura proteica em forma de seringa, conhecida como sistema de secreção do tipo III (T3SS). Junto com esse complexo, a adesina

IcsA recentemente descrita, facilita a adesão da bactéria ao epitélio intestinal (BROTCKE ZUMSTEG et al., 2014). O T3SS libera proteínas efetoras no citosol da célula hospedeira, esses efetores atuam diretamente no citoesqueleto, promovendo a polimerização e despolimerização de actina, rearranjos que formam um vacúolo macropinocítico que engloba a bactéria para o interior da célula epitelial (ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015; KILLACKY; SORBARA; GIRARDIN, 2016b). Os principais efetores envolvidos no processo inicial de entrada são: IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpgB1, IpgD e virA (WANG et al., 2013).

Após sua internalização, *Shigella* recruta outros efetores: IpaH, IcsB, IcsA, OspG, OspF que ajudam na infecção tardia da bactéria. Dentro do citoplasma *Shigella* promove a lise do vacúolo fagocítico, se multiplica e recruta a proteína de superfície IcsA que começa a polimerização de actina formando uma cauda em um dos polos da célula bacteriana (PROSSEDA et al., 2012), possibilitando seu movimento em todo citoplasma e sua propagação para célula adjacente (AGAISSE, 2016; ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015).

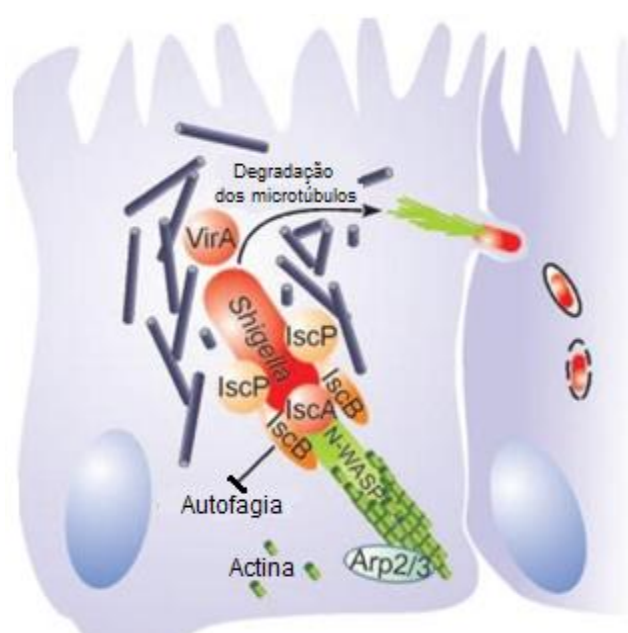


Figura 3: O complexo formado pela proteína IcsA da *S. flexneri*. O complexo formado pela proteína IcsA da *S. flexneri* mais a proteína N-WASP da célula hospedeira, recruta outro, o Arp2/Arp3, que faz a mediação da nucleação para aumentar a cauda de actina. O movimento é facilitado por VirA, que abre 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: Adaptado de Schroeder e Hilbi (2008).

A resposta imunológica do hospedeiro é imediata à invasão de *Shigella*; receptores extracelulares (Toll-like) e intercelulares (Nod-like) detectam fragmentos de peptidoglicanos

e lipopolissacarídeos (LPS) liberados pelos patógenos e ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B), um importante fator de transcrição de citocinas e quimiocinas que são essenciais para erradicação do patógeno (KILLACKEY; SORBARA; GIRARDIN, 2016b; WANG et al., 2013).

Entretanto, *Shigella* apresenta inúmeros mecanismos de defesa, que atenuam a via de sinalização NF- κ B (serão vistos mais adiante), com isso o processo de infecção continua, assim como sua disseminação para as células adjacentes, causando a destruição de todo epitélio gastrointestinal (ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015). A figura 4 ilustra todos os mecanismos de invasão descritos anteriormente.

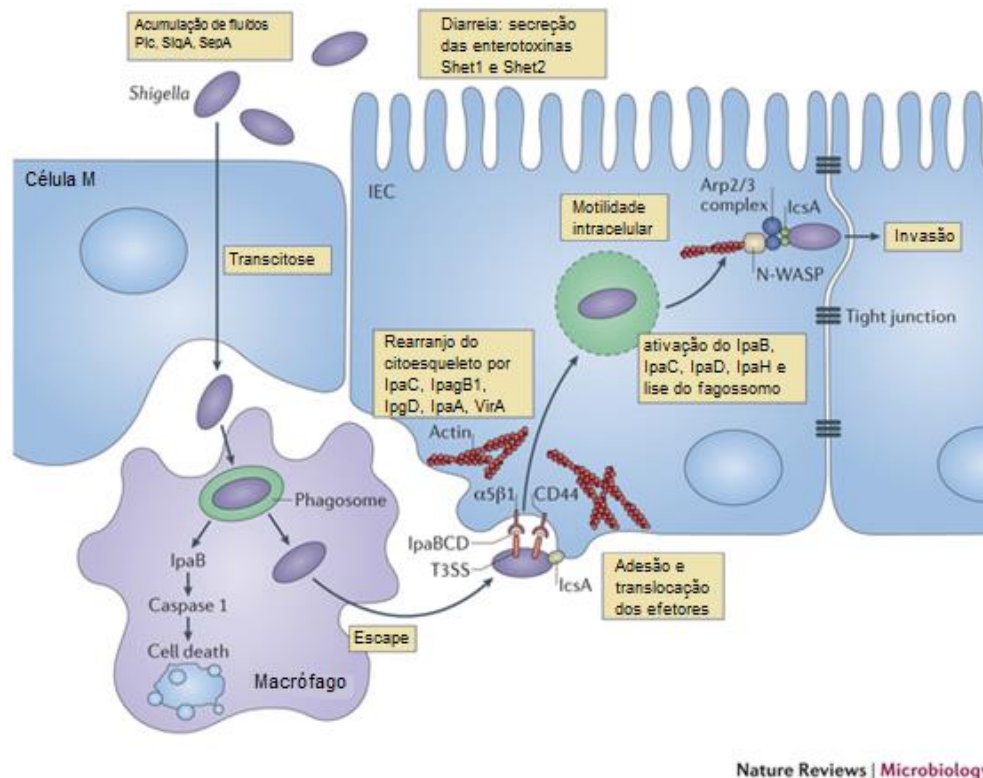


Figura 4: Mecanismos da patogenicidade de *Shigella* no epitélio intestinal. Inicialmente *Shigella* spp. é translocada pelas células M do lúmen para a submucosa do intestino, onde são fagocitadas por macrófagos residentes. No interior do macrófago a bactéria lisa e vacúolo e escapa para o citoplasma e causa a morte programada da célula. Ao ser liberada entra em contato com a parte basolateral da célula epitelial e ativa o T3SS e a adesina IcsA, que ajuda na adesão a célula. O T3SS libera proteínas efetoras no citoplasma da célula epitelial que formam uma rede de actina ao redor da bactéria e a engloba para o interior da célula hospedeira. No interior da célula a bactéria lisa o vacúolo, sintetiza uma cauda de actina que possibilita seu movimento intracelular, sua multiplicação e disseminação para as células adjacentes. Fonte: Adaptado de THE et al., (2016).

1.3 *Shigella* spp.: MECANISMO MOLECULAR

Uma série de descobertas tem permitido o progresso na compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais *Shigella* fixa-se nas células epiteliais do intestino, invadindo-as e se disseminando; O processo de patogênese desta bactéria é mediado por genes cromossomais e plasmidiais (SANSONETTI, 2001).

O genoma bacteriano apresenta sequências denominadas ilhas genômicas, que se diferenciam do resto do genoma pelo seu teor de guanina e citosina. As ilhas genômicas 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 (DARMON; LEACH, 2014; LEE, 1996).

1.4.1 Plasmídeo

Todas as espécies de *Shigella* que apresentam o fenótipo invasivo possuem um grande plasmídeo de virulência de 220-Kb. Nesse plasmídeo são encontrados os genes necessários para invasão nas células epiteliais, disseminação e morte dos macrófagos (Fig. 5) (SANSONETTI et al., 2001; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014). No entanto, *Shigella* necessita de condições adequadas para expressar os genes de virulência, ou seja, condições próximas ao epitélio específico, como temperatura a 37°C e pH em torno de 7,4 (KANE; DORMAN, 2012; VENKATESAN et al., 2001).

O plasmídeo de virulência de *Shigella* é um mosaico de genes, composto por várias sequências de inserções (IS) (BAKER et al., 2014), que são elementos de transposição que causam rearranjos dentro do genoma como deleções ou inserções além de apresentar genes com um teor de G+C de 30 a 60 mol%, sugerindo que foram adquiridos por fontes distintas (GALL, 2005).

Os genes de virulência estão distribuídos em todo o plasmídeo, mas uma região de 31-Kb concentra a maior parte dos genes de virulência, o *locus Ipa-mix-spa*, conhecido por ser o centro de patogenicidade de cepas patogênicas de *Shigella* spp. (Fig. 6) (SCHROEDER; HILBI, 2008; VENKATESAN et al., 2001).

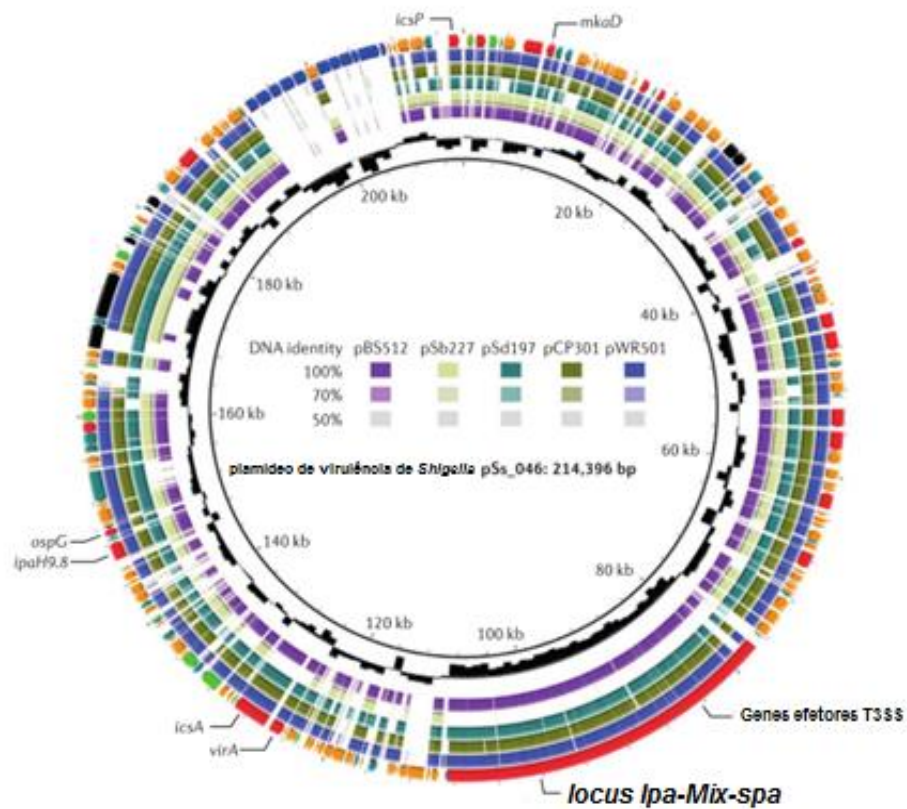


Figura 5: Mapa genético comparativo dos plasmídeos de virulência de *Shigella* spp. O plasmídeo de virulência de *S. sonnei* pSs_046 foi usado como referência para comparação usando a ferramenta **Blastn** e está representado pelo anel interno (preto), o segundo anel representa o conteúdo de GC (preto) de pSs_046. Os anéis roxo e verde pálido representam os plasmídeos de *S. boydii* str. BS512 e *S. boydii* str. Sb227. O cerceta (verde-azulado) representa *S. dysenteriae* str. Sd197, seguido dos anéis cáqui (marron) e azul que correspondem a *S. flexneri* F2a str. 301 (pCP301) e *S. flexneri* F5a (pWR501) respectivamente. O anel externo representa a identificação dos genes baseados em sua função: o *locus mix-spa* (vermelho) que codifica os principais genes de virulência, incluindo o T3SS; Transposons, sequências de inserção e elementos transmitidos por fagos (laranja); genes de replicação do plasmídeo, transferência e manutenção (preto); a região de síntese do antígeno-O específico de *S. sonnei* (azul); e os genes que codificam proteínas com outras funções conhecidas (verde).

Fonte: Adaptado de The et al., (2016).

As Ilhas de patogenicidade (PAI) ou centro de patogenicidade foi primeiramente descrita por Hacker e colaboradores em 2000, quando estudavam fatores de virulência de *Escherichia coli* urupatogênica (UPEC) (GAL-MOR; FINLAY, 2006; VIEIRA, 2009).

O PAI é adquirido por transferência horizontal, sua aquisição pode resultar na mudança do fenótipo e comportamento da bactéria, contribuindo para colonização e adaptação a novos nichos (DARMON; LEACH, 2014).

Os PAIs codificam diversos genes relacionadas a virulência, entre eles podemos destacar os fatores de adesão e invasão na célula hospedeira, produção de toxinas e aquisição de ferro (DARMON; LEACH, 2014).

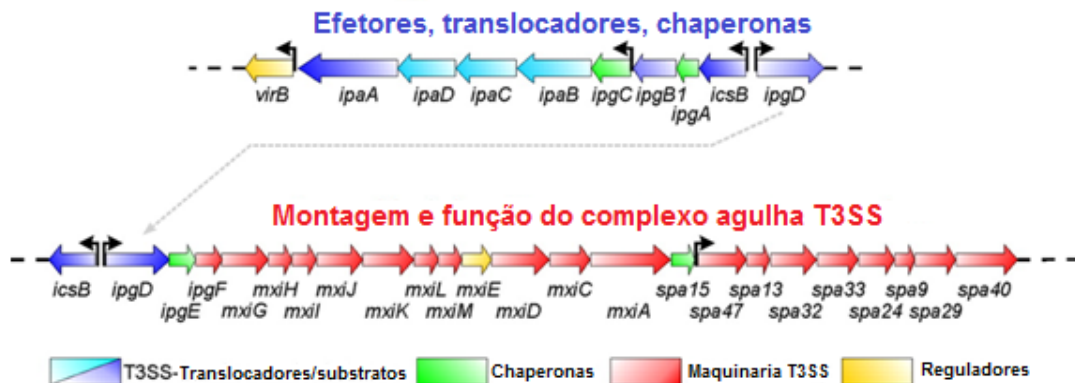


Figura 6: Ilha de patogenicidade de *Shigella*. O PAI compreende genes responsáveis pela invasão e disseminação de *Shigella* nas células epiteliais; Genes que codificam para o sistema de secreção T3SS; e que causam a morte do macrófago. Fonte: Adaptado de Schroeder e Hilbi (2008).

O PAI também inclui genes que formam o sistema de secreção do tipo III (T3SS), um aparelho secretório que é utilizado por muitos enteropatógenos como *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* spp. (PARSOT, 2009).

O T3SS é codificado pelos genes *mix* “membrane excretion of *Ipa*” e *spa* “surface presentation of invasion plasmid antigen”, é composto por aproximadamente 50 proteínas diferentes que formam uma estrutura em forma de seringa com o corpo basal ancorado na membrana bacteriana e uma agulha externa que se estende até a membrana da célula-alvo formando um poro que transloca proteínas efetoras para o citosol do hospedeiro (Fig. 7) (BARISON; GUPTA; KOLBE, 2013; KANE; DORMAN, 2012; PARSOT, 2009).

A temperatura é um fator essencial para expressão do T3SS; Na presença de temperaturas acima de 32°C, os reguladores de transcrição *VirF* e *VirB* são ativados e

promovem a expressão do *operon Mix-Spa*, que conduz a montagem do T3SS na superfície da membrana da bactéria. Portanto em temperaturas adequadas a bactéria apresenta vários T3SS montados na superfície de sua membrana plasmática, porém inativos, sendo que, esse complexo só é ativado em contato com a célula do hospedeiro (CAMPBELL-VALOIS; PONTIER, 2016).

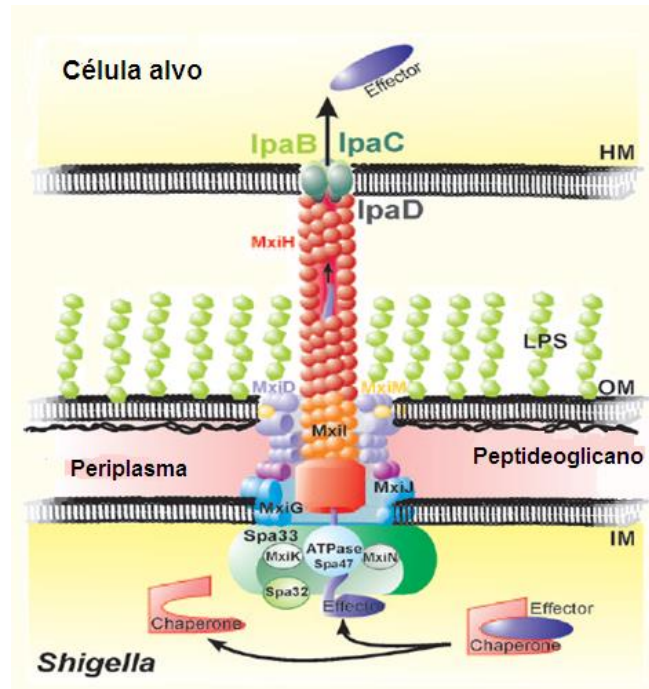


Figura 7: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III (T3SS) de *Shigella flexneri*.

Fonte: Adaptado de Schroeder e Hilbi (2008).

O sistema de secreção do tipo III (T3SS) libera mais de 30 proteínas efetoras através de seu canal secretório (CAMPBELL-VALOIS; POTIER, 2016) (Fig. 8). Entre essas proteínas, temos as translocadoras IpaB, IpaC e IpaD, as efetoras IpaA, IpgB1, IpgD, IcsB (~25 efetoras) e duas ativadoras de transcrição VirB e MxiE, todas codificadas na ilha de patogenicidade (CHATTERJEE et al., 2013; PARSOT, 2009).



Figura 8: Expressão de proteínas efetoras dependente, parcialmente dependente ou não dependente da atividade do T3SS. Em verde pode-se observar efetores que são expressos independentemente da atividade do T3SS; Em roxo os efetores totalmente dependentes da atividade do T3SS; Efetores que foram identificados no citoplasma antes da ativação do T3SS e após a ativação a expressão foi aumentada estão mostrados na sobreposição. Fonte: Adaptado de Parsot (2009).

Outros genes presentes no plasmídeo são: *Sen*, *VirA*, *OspB* (*C,D,E,F,G*), *IcsA*, *IcsP*, *VirK*, *MsbB2* e *SepA*. Alguns destes genes são codificados por famílias multigênicas como: cinco *IpaHs*, quatro *OspC*, três *OspD* e dois *OspE* (GALL, 2005; KANE; DORMAN, 2012) (Fig. 8).

Podemos destacar alguns genes presentes no plasmídeo: o gene *VirF*, um regulador transcricional, membro da família AraC, responsável pela transcrição de *VirB* e *IcsA*; o gene *VirB*, regulador transcricional responsável pela expressão dos *operons* que codificam os genes de invasão, e o gene *IcsA/VirG* que codifica a proteína de membrana externa responsável pela propagação de célula-a-célula e recentemente foi descrita como sendo uma adesina (BROTCKE ZUMSTEG et al., 2014; MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012).

1.4.2 Genes Cromossomais

Shigella spp. possuem um único cromossomo circular com mais de 200 pseudogenes, cerca de 300 a 700 elementos IS, várias remoções, translocações, inversões e inserções. *Shigella* se tornou um patógeno altamente virulento e sua patogenicidade se deve à grande diversidade de genes que foram adquiridos por evolução convergente através de transferência horizontal a partir de bacteriófagos, além da transposição de elementos IS e formação de pseudogenes (NIE et al., 2006; UD-DIN; WAHID, 2014).

O cromossomo de *Shigella*, assim como o plasmídeo, contém ilhas de patogenicidade (SHI-1, 2 e 3; SHI-O e SRL), essas ilhas diferem entre as cepas de *Shigella* e ajudam na

diversificação de fenótipos de virulência. A ilha SHI-1 apresenta genes de virulência importantes, como a Protease citotóxica imunoglobulina A-like (*SigA*), e a enterotoxina-1 (*Set1*), ambas importantes fatores que induzem o acúmulo de fluidos intestinais e estão relacionados com a diarreia aquosa. Também contém o gene de uma serinoprotease (*Pic*) que degrada o muco da mucosa intestinal (SCHROEDER; HILBI, 2008).

O cromossomo também contém genes responsáveis pela regulação da expressão gênica global, além de genes que detectam as mudanças ambientais como pH e temperatura. Outros genes importantes são os que codificam as proteínas Fis, IHF e H-NS que estão envolvidas na regulação de *VirF* e *VirB*. Fis e IHF regulam positivamente o gene *VirF* e H-NS regula negativamente tanto os genes *VirF* como *IcsA* pela ligação direta aos promotores se em temperaturas inferiores a 32°C (SCHROEDER; HILBI, 2008).

1.4.3 Fatores de virulência

1.4.3.1 Enterotoxinas Shet1 e She2

Duas enterotoxinas são essenciais na patogenicidade de *Shigella flexneri* denominadas Shet1 e Shet2 cujas fases abertas de leitura (ORFs) estão no cromossomo e plasmídeo, respectivamente; ambas são reguladas pela presença de ferro (SOUSA et al., 2013; FARFÁN et al., 2011). A enterotoxina 1 é produzida predominantemente por *Shigella flexneri* 2a e raramente por outros sorotipos (FASANO et al., 1997; SOUSA et al., 2013). Shet1 é um complexo proteico de 55 KDa, a análise da sequência da enterotoxina Shet1 revelou um sistema interessante para a composição desse complexo. Na verdade Shet1 foge um pouco da definição usual de gene, pois nesse locus são encontradas duas ORFs reguladas pelo mesmo promotor e separadas entre si por apenas 3 bp, uma ORF tem 534 pb (*Set1A*) e a outra tem 186 pb (*Set1B*), construção semelhante a um *operon* (FASANO et al., 1997). Em termos de estrutura Shet1 possui dois tipos de subunidades, uma codificada pelo gene *Set1A* e cinco subunidades B, codificadas pelo gene *Set1B* (SOUSA et al., 2013; NATARO et al., 1995). A ação dessa enterotoxina leva à diarreia aquosa característica da Shigellose (THONG et al., 2005).

A enterotoxina 2 (Shet2) foi primeiramente descrita em *Escherichia coli* enteroinvasiva EI-34, e é secretada por vários sorotipos de *Shigella* (FARFÁN et al., 2011; NATARO et al., 1995). Shet2 é codificada pelo gene *SEN(OspD3)*, presente no plasmídeo de invasão e contém apenas uma cadeia polipeptídica de 62.8 KDa (FAHERTY et al., 2016;

FASANO et al., 1997;). Farfán e colaboradores (2011) defendem que *SEN* seja regulado pelo *MixE* (ativador de transcrição) e que tenha um importante papel na fase de infecção intracelular de *Shigella*.

No estudo realizado por Faherty e colaboradores (2016), foi confirmado que Shet2 apresenta duas funções, tanto como enterotoxina e como regulador da secreção da interleucina-8 (IL-8) em células infectadas. O estudo propõe que Shet2 interfere na expressão da IL-8, com o propósito de atenuar a resposta imune do hospedeiro, uma vez que a IL-8 é um mediador da resposta imune inata contra patógenos intracelulares.

1.4.3.2 Genes *IpaHs*

Os genes *IpaH* pertencem à família Ubiquitina ligase E3, estão presentes no genoma de vários patógenos gram-negativos incluindo *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* entre outros, e codificam para uma família de proteínas conservadas que compartilham características funcionais e estruturais em comum, como uma repetição no N-terminal rica em leucina (LRR) e uma região altamente conservada de 300 resíduos no domínio C-terminal (CTR) (Fig. 9). Essa região conservada possui um resíduo de cisteína (Cys) que é essencial para a atividade da Ubiquitina ligase E3 (ASHIDA; NAKANO; SASAKAWA, 2013; ASHIDA; SASAKAWA, 2016).

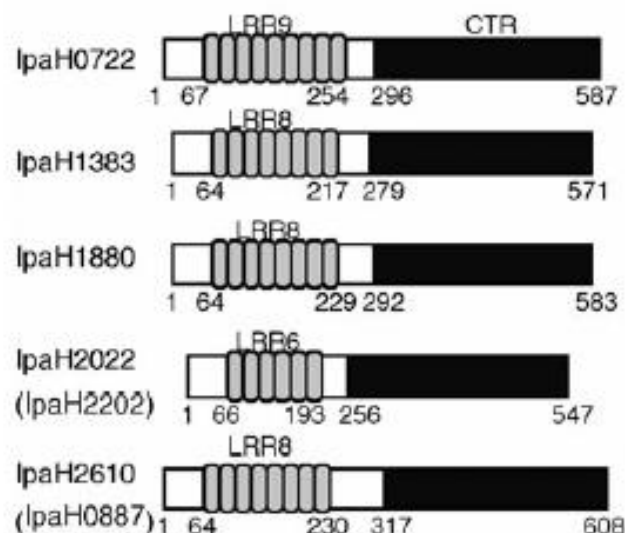


Figura 9: Representação esquemática da estrutura da família de proteínas *IpaH* presentes no cromossomo. Em cinza, o domínio LRR e em preto, o domínio CRT. Fonte: Ashida et al. (2010).

A ubiquitina é uma pequena proteína que marca proteínas indesejadas para posteriormente serem degradadas por um complexo proteico denominado proteassoma. A marcação do substrato ocorre através de uma ligação covalente de ubiquitina (Ubiquitinação) (KIM et al., 2014).

A ubiquitinação envolve uma cascata multienzimática catalisada por três enzimas: a enzima **E1** que ativa a molécula de ubiquitina, a enzima **E2**, conhecida como enzima de conjugação, transfere a ubiquitina de E1 para E2 e libera E1, e a enzima **E3**, ou ubiquitina ligase, reconhece e se liga à proteína alvo, recruta E2 ubiquitinadas e as liga nos substratos específicos que são então ubiquitinados, processo esse mediado por efetores **ubiquitina ligase E3**, que facilitam a transferência de ubiquitinas a partir de E2 para o substrato específico (HICKS; GALÁN, 2010; ZHOU; ZHU, 2015).

A ubiquitinação é um mecanismo presente unicamente em eucariotos, é caracterizada como uma modificação pós-traducional que regula vários processos celulares incluindo a sinalização celular, resposta imune, degradação de proteína, transcrição e endocitose (ASHIDA; SASAKAWA, 2016; TANNER; BRZOVIC; ROHDE, 2015).

Vários patógenos incluindo *Shigella* sequestram o mecanismo de ubiquitinação do hospedeiro através da entrega efetores com funções de ubiquitina ligase E3. Esses efetores utilizam a ubiquitinação para neutralizar as vias de sinalização que ativam a resposta imune do hospedeiro (ASHIDA; SASAKAWA, 2016; ZHOU; ZHU, 2015).

Shigella tem doze efetores IpaH no seu genoma, cinco no plasmídeo de virulência e sete em seu cromossomo (ASHIDA; SASAKAWA, 2016; CRUZ et al., 2014). Três desses efetores (IpaH0722, IpaH4.5 e IpaH9.8) tem como alvo as vias de sinalização que ativam o fator nuclear kappa B (NF-kB), uma vez que, o NF-kB desempenha um papel crucial na ativação da resposta imune contra patógenos bacterianos (Fig. 10) (ASHIDA; SASAKAWA, 2016).

A invasão nas células epiteliais e a posterior lise da membrana vacuolar são reconhecidos como Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) que imediatamente ativam o NF-kB através da via PKC-NF-kB. O efector IpaH0722 (codificada pelo gene *IpaH1*) foi mostrado para ser uma ubiquitina ligase E3, que interage com TRAF2 (molécula intermediária da via PKC), que posteriormente é degradado pelo proteassoma, impedindo a ativação do fator NF-kB (ASHIDA; NAKANO; SASAKAWA, 2013).

Os peptideoglicanos decorrentes da invasão de *Shigella* são reconhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e ativam o fator NF-kB através da via dependente de Nod1. Ashida e colaboradores (2010) relataram com o efector IpaH9.8 interage

com Nemo, um intermediário crítico para ativação do NF- κ B, e promove a ubiquitinação da molécula para degradação proteossômica, e inibe a via de sinalização.

Em um estudo realizado por Okuda e colaboradores (2005) foi verificado que o efector IpaH 9.8, interage com o fator de *splincig* U2AF³⁵ e regula negativamente a expressão de um subconjunto de genes que codifica quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas, assim diminuindo a resposta inflamatória do hospedeiro.

Segundo resultados da pesquisa realizada por Wang e colaboradores (2013) quanto à função do efector IpaH4.5, foi demonstrado que essa proteína apresenta a função de ubiquitina ligase E3 para a subunidade p65 do fator NF- κ B, afetando a transcrição desta via.

Assim, ao liberar os efetores com atividade de ubiquitina ligase E3, *Shigella* cria um ambiente favorável à colonização e o progresso da infecção bacteriana, por suprimir a resposta inflamatória através da inativação do fator NF- κ B (ASHIDA; SASAKAWA, 2016; WANG et al., 2013).

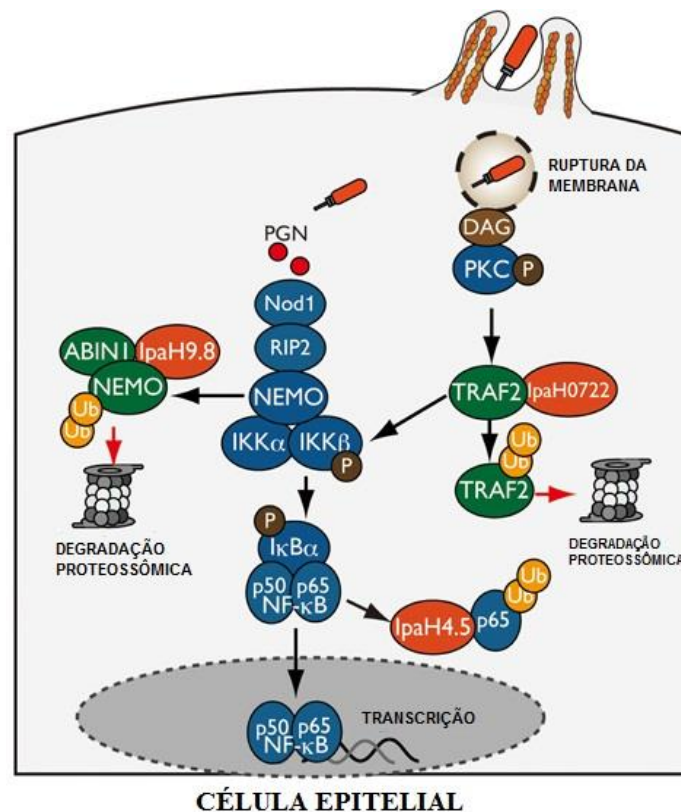


Figura 10: Proteínas IpaH tem alvos específicos para ubiquitinação na célula epitelial. Os efetores IpaH0722, IpaH9.8 e IpaH4.5 interagem com TRAF2, NEMO e p65 respectivamente, promovem a ubiquitinação desses substratos que posteriormente são degradados pelo complexo proteossômico, impedindo a ativação do fator NF- κ B. Fonte: Adaptado de Ashida; Sasakawa, (2016).

Para ultrapassar a barreira gastrointestinal *Shigella* precisa subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro. O primeiro passo é induzir a morte celular do macrófago para obter acesso à região basolateral da célula epitelial (ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015).

Shigella libera o efector IpaH7.8, uma ubiquitina ligase E3 no citoplasma do macrófago, e tem como alvo a proteína GLMN. GLMN é um regulador negativo de inflamassomas, sua ubiquitinação e degradação proteossômica desencadeia a ativação dos inflamassomas (NLRP3 e NLRC4) e da caspase-1, causando a liberação de IL-1 β e IL-18 e a morte celular do macrófago por piroptose (Fig. 11) (SUZUKI et al., 2014). A piroptose é uma morte celular programada, dependente da ativação de caspases (caspases 1 ou 11), e subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015).

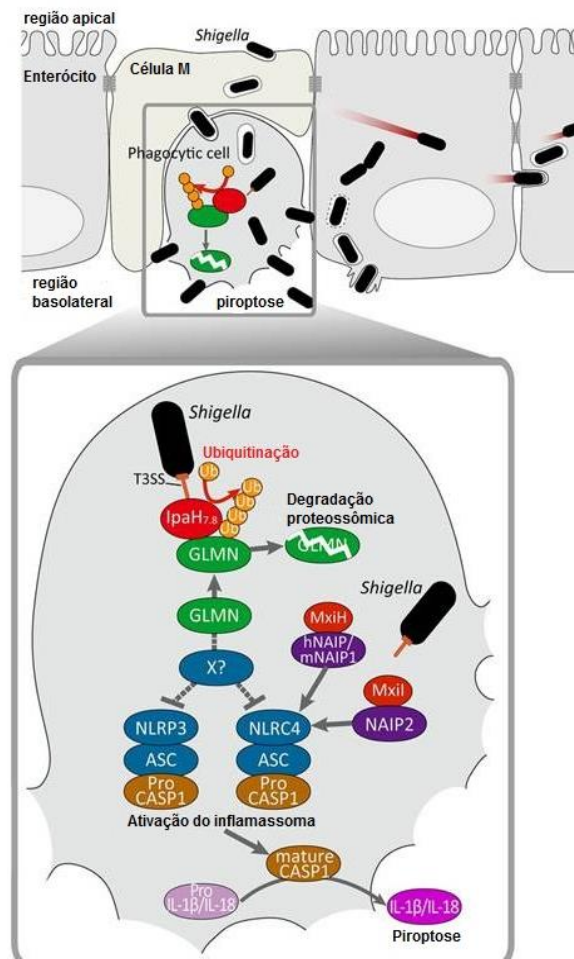


Figura 11: Morte do macrófago por piroptose. *Shigella* entrega o efector IpaH7.8 e tem como alvo a proteína GLMN, que é ubiquitinada e sofre degradação proteossômica, processo que ativa os inflamassomas NLRP3 e NLRC4 que clivam a caspase-1, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a morte celular do macrófago por piroptose. Fonte: Adaptado de Suzuki et al., (2014).

Tabela 1: Resumo dos efetores IpaHs de *Shigella*

Efetores	Localização	Alvo do hospedeiro	Atividade enzimática	Função
IpaH0722	Cromossomo	TRAF2	Ubiquitina ligase E3	Inativação do fator NF-kB.
IpaH9.8	Plasmídeo	U2AF35; NEMO	Ubiquitina ligase E3	Supressão da resposta imune; Inativação do fator NF-kB.
IpaH4.5	Plasmídeo	p65	Ubiquitina ligase E3	Inativação do fator NF-kB.
IpaH7.8	Plasmídeo	GLMN	Ubiquitina ligase E3	Inativação do fator NF-kB.

1.4.3.3 Genes *Ipas*

Outro grupo de genes envolvidos na patogenicidade de *Shigella* são os que codificam para as invasinas Ipas (antígenos de invasão do plasmídeo). Entre esse efetores temos, o IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, todos são necessários para a entrada de *Shigella* na célula epitelial (DEMALI; JUE; BURRIDGE, 2006; PARK et al., 2011).

A invasina **IpaA** imita a função de proteínas associadas ao complexo de adesão focal. Esse complexo conecta o citoesqueleto do enterócito com a matriz extracelular através de integrinas em consórcio com proteínas adaptadoras, como a talina e a vinculina (LEE; PARK; PARK, 2014).

IpaA é uma proteína com 633 resíduos de aminoácidos que possui no domínio N-terminal uma ligação de chaperona e no domínio C-terminal uma cauda helicoidal, sendo que as duas últimas hélices têm sítios de ligação para vinculina (VBSs), ao qual se liga o domínio Vh1 da vinculina formando o complexo IpaA-vinculina. Esses VBSs são necessários para a entrada de *Shigella* nas células do hospedeiro. Os VBSs são α -hélices de 19 resíduos encontrados em ativadores da vinculina como talina, α -actinina e invasina IpaA (PARK et al., 2011).

Vinculina é uma proteína do citoesqueleto, que apresenta feixes em hélice; no domínio N-terminal (Vh1) apresenta sete hélices com sítios de ligação para talina e α -actinina e no domínio C-terminal (Vt) cinco hélices com sítios de ligação para *F*-actina (Fig. 12) (DEMALI; JUE; BURRIDGE, 2006; IZARD; TRAN VAN NHIEU; BOIS, 2006; PARK et al., 2011).

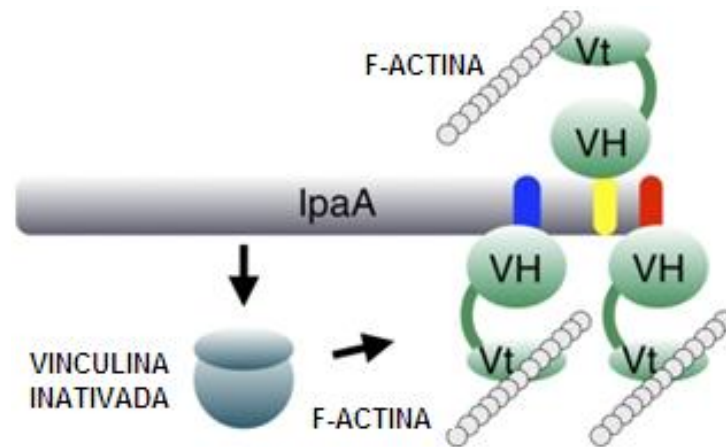


Figura 12: Sítios de ligação para vinculina (VBSs); VBS1 em vermelho, VBS2 em amarelo e VBS3 em azul, qualquer um dos três VBSs podem ativar a vinculina pela ligação no domínio VH por conversão do feixe hélice que corta a vinculina (indicado pela mudança de cor). A vinculina ativada pode-se ligar a F-actina por meio de interações vinculadas pelo domínio Vt. Esse complexo IpaA-vinculina facilita a entrada de *Shigella* nas células epiteliais. Fonte: Adaptado de Park et al. 2011.

Através do complexo IpaA-vinculina, *Shigella* controla a montagem e desmontagem dos filamentos de actina do citoesqueleto, uma vez que, vinculina é uma proteína adaptadora do complexo de adesão focal, e serve como intermediária na remodelação dos filamentos, aumentando a endocitose da bactéria durante a invasão no enterócito (LEE; PARK; PARK, 2014; YANG et al., 2015).

O **IpaB** é um fator de virulência indispensável, visto que, atua em varias fases da patogênese de *Shigella* (PICKING; PICKING, 2016; YANG et al., 2015) (Fig.13).

IpaB possui várias estruturas secundárias conservadas, um domínio de ligação de chaperona (IpgC), duas regiões em espiral enroladas, um domínio helicoidal (α -hélice) que é importante para a dobragem adequada e estabilidade intrabacteriana do IpaB, dois domínios transmembranares hidrofóbicos que são requeridos para penetrar a membrana da bicamada do hospedeiro, além do domínio de ligação de IpaC (SHEN et al., 2010).

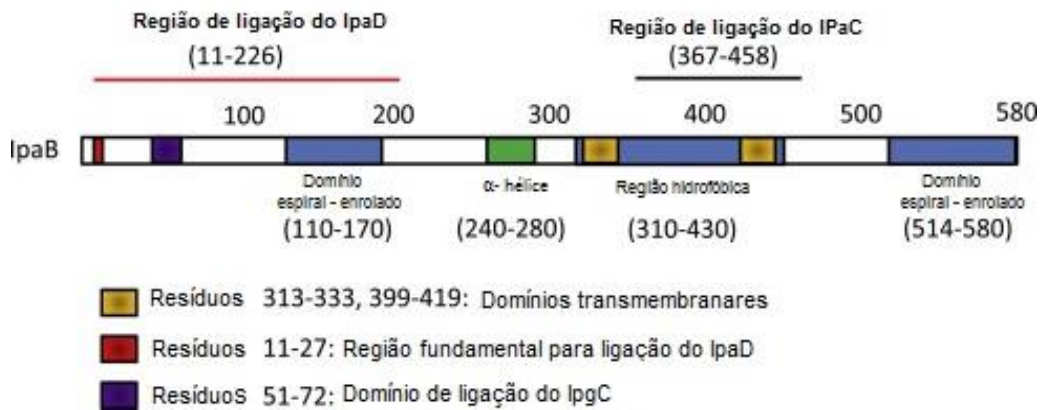


Figura 13: Esquema da estrutura secundária e regiões funcionais do efector IpaB. Legenda: Região de ligação do IpaD (resíduos 11-226); Região de ligação do IpaC (resíduos 367-458); Domínios transmembranares (resíduos 313-333, 399-419); Domínios em espiral enrolados (resíduos 110-170, 514-580); Domínio de α -hélice (resíduos 240-280); Região hidrofóbica (resíduos 310-430); Domínio de ligação do IpgC (resíduos 51-72).

Em 1997, Zychlinsky e Sansonetti publicaram um estudo propondo que a morte do macrófago induzido pela *Shigella* parece ser a chave intermediária, o link entre a infecção e a inflamação. A morte dos macrófagos é mediada pelos efetores IpaB e IpaH 7.8 (descrito na seção anterior). No citoplasma do macrófago o efector IpaB constrói um canal de íons na membrana interna da célula, causando o influxo de potássio que imediatamente promove a ativação do inflamassoma – *NLRC4*, que ativa caspase-1 e induz a morte da célula por piroptose (ASHIDA; MIMURO; SASAKAWA, 2015)(Fig 14).

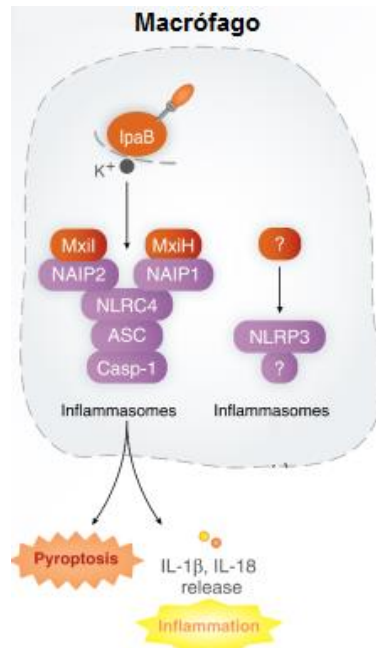


Figura 14: Morte do macrófago por piroptose. *Shigella* é fagocitada, escapa do vacúolo fagocítico, libera o efector IpaB pelo T3SS ativando o inflamassoma causando a morte da célula. Fonte: Adaptado de ASHIDA; KIM; SASAKAWA, 2014)

Após a morte do macrófago a *Shigella* tem acesso à região basolateral da célula epitelial. Nesse passo o efector IpaB também apresenta um papel fundamental (YANG et al., 2015).

O IpaB fica localizado na ponta da agulha do sistema de secreção T3SS, e em contato com o enterócito reconhece a superfície da célula e se liga ao receptor CD44 e ao colesterol, em seguida promove a sua inserção na membrana plasmática através de seu domínio hidrofóbico (PICKING; PICKING, et al., 2016; YANG et al., 2015) e regula a liberação de proteínas efectoras através desse translocon (Fig. 15) (ROEHRICH et al., 2010; SHEN et al., 2010).

Outra função do efector IpaB descrita recentemente, relata que o mesmo está envolvido com a fragmentação e desaparecimento do Complexo de Golgi, afetando a reciclagem e transporte de moléculas essenciais para a manutenção da célula hospedeira facilitando a ruptura da barreira epitelial, assim como interfere na secreção e maturação de proteínas envolvidas no processo fisiológico e imunológico, tais como, os mediadores da defesa antimicrobiana (receptores de superfície celular, citocinas e quimiocinas) (CARAYOL; TRAN VAN NHIEU, 2013; MOUNIER et al., 2012).

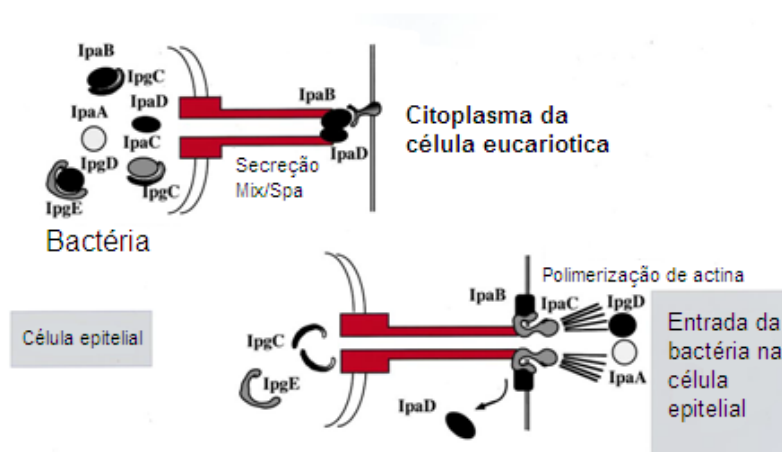


Figura 15: Esquema do sistema de secreção T3SS e seus translocadores. IpaB e IpaC em contato com as células hospedeiras formando um poro que injeta proteínas efetores diretamente no citoplasma das células infectadas. Fonte: Adaptado de Sansonetti (2001).

IpaC possui propriedades bioquímicas importantes para entrada de *Shigella* nas células hospedeira. Na região C-terminal da proteína apresenta um domínio para polimerização de actina, e na região N-terminal um domínio para ligação de chaperona seguido de duas hélices transmembranares (LEE; PARK; PARK, 2014).

IpaC forma um complexo com IpaB; No contato inicial do patógeno com a célula hospedeira ambos são transportadas através da agulha e são inseridos na membrana celular formando um poro de 25 Å (angstrom) permitindo que outros efetores sejam liberados no citosol (Fig. 15) (CARAYOL; TRAN VAN NHIEU, 2013; LEE; PARK; PARK, 2014).

Esse efector induz a polimerização e nucleação de actina através da interação com a proteína quinase Src que ativa duas Rho GTPases (Cdc42 e Rac1). Essas proteínas regulam a dinâmica dos filamentos de actina do citoesqueleto (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012).

IpaD é uma proteína globular de 36 kDa, com um domínio N-terminal de ligação da proteína chaperona, e um domínio distal que está associado ao controle e secreção do IpaB na ponta da agulha do T3SS (EPLER et al., 2009, 2012).

IpaD parece ser o sensor da agulha do sistema de secreção e funciona como detector de pequenas moléculas no ambiente intestinal como sais biliares, com isso controla o complexo agulha e a secreção de proteínas prematuramente. Após a exposição do IpaD a sais biliares, o mesmo sofre mudanças conformacionais que promove o recrutamento do translocador IpaB para a ponta da agulha que reconhece os componentes da membrana

plasmática dos enterócitos e recruta outro translocador, o IpaC, completando a maturação do poro do sistema de secreção T3SS (BARTA et al., 2012; DICKENSON et al., 2013; SCHIAVOLIN et al., 2013). Na Tabela 2 podemos observar a função e a localização de alguns dos genes citados anteriormente.

Tabela 2: Função dos efetores e localização dos genes que utilizados no estudo.

GENE	PROTEÍNA	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO
<i>IpaA</i>	IpaA	Despolimerização de actina	Plasmídeo
<i>IpaB</i>	IpaB	Induz a apoptose do macrófago; regula a excreção de efetores na ponta do T3SS	Plasmídeo
<i>IpaC</i>	IpaC	Polimerização de actina, ativação do Cdc42 e Rac	Plasmídeo
<i>IpaD</i>	IpaD	Forma o complexo com o IpaB e controla o fluxo de proteínas através do T3SS	Plasmídeo
<i>Set1A</i>	SHET1	Enterotoxina responsável pela diarreia aquosa	Cromossomo
<i>Set1B</i>			
<i>SenA</i>	SHET2	Enterotoxina; Regula a secreção da interleucina 8 (IL-8)	Plasmídeo
<i>SenB</i>	Homólogo de SHET2	Função desconhecida	Plasmídeo
<i>IpaH 1</i>	IpaH0722	ubiquitina TRAF2 que é degradado, impedindo a ativação da via PKC-NF-kB	Cromossomo
<i>IpaH 1.4</i>	IpaH1.4	Função desconhecida	Plasmídeo
<i>IpaH 2.5</i>	IpaH2.5	Função desconhecida	Plasmídeo
<i>IpaH2</i>	IpaH0887	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH3</i>	IpaH1383	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH4</i>	IpaH1880	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH 4.5</i>	IpaH4.5	Regula a resposta inflamatória do hospedeiro através da inibição da via de sinalização NF-kB	Plasmídeo
<i>IpaH 5</i>	IpaH2022	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH6</i>	IpaH2202	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH 7</i>	IpaH2610	Função desconhecida	Cromossomo
<i>IpaH 7.8</i>	IpaH7.8	Facilita o escape da bactéria do vacúolo fagocítico do macrófago; Causa a morte do macrófago por piroptose	Plasmídeo
<i>IpaH 9.8</i>	IpaH9.8	No núcleo interage com o fator de splicing afetando a transcrição de genes que codificam quimiocinas e citocinas; Interage com NEMO impedindo a ativação do fator NF-kB	Plasmídeo

2. JUSTIFICATIVA

Shigella é uma bactéria altamente patogênica, está entre os patógenos mais associados à mortalidade e morbidade de crianças menores de 5 anos. Os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de *Shigella* há décadas vêm sendo investigados, alguns com funções estabelecidas e bem caracterizadas, porém estudos que relacionem os genes de virulência de *Shigella* com a presença de sintomas variados ainda são bastante escassos.

Um estudo preliminar realizado por nosso grupo, com cepas clínicas de *Shigella*, constatou uma variação na presença dos genes de virulência. Também foi observado uma relação entre a presença da enterotoxina Shet1 com o sintoma de diarreia, e o gene *IpaH* com a febre e presença de sangue nas fezes.

Com isso, propomos a realização da tipagem molecular de um número maior de genes de virulência, para verificar o perfil regional genético das cepas de *Shigella*. Assim, como realizar a genotipagem dos genes para identificar as variantes genéticas que podem estar relacionadas com diferentes fenótipos, originando uma sintomatologia diversificada entre os pacientes.

3. OBJETIVO GERAL

- Analisar a variabilidade genética de alguns fatores de virulência de amostras clínicas de *Shigella flexneri*

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Investigar a presença dos genes do sistema de secreção *Ipa*, dos genes *IpaHs* e das enterotoxinas Shet1A e Shet1B nas cepas clínicas de *Shigela* por PCR;
- Sequenciar os amplicons e analisar as sequências obtidas com as disponíveis no “GenBank” para identificar variabilidade genética.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES *in silico*: SELEÇÃO DOS GENES E DESENHO DOS INICIADORES:

Os genes foram selecionados conforme os fatores de virulência de *Shigella* que se pretendiam estudar (Tabela 04 e 05). De posse dos nomes, recuperamos as sequências nucleotídicas desses genes de bancos de dados online como o nr e RefSeq do GenBank NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e do banco de dados de *Shigella*, o shiBASE (<http://www.mgc.ac.cn/ShiBASE/>).

Como o interesse era analisar a ORF inteira dos genes, optamos por ancorar os iniciadores nas regiões intergênicas (Fig. 16), mesmo correndo certo risco de polimorfismo de sequência nas regiões escolhidas. Entretanto para minimizar essa possibilidade, fizemos um alinhamento de múltiplas sequências utilizando o programa ClustalW2 disponível online (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), para escolher a região de maior identidade entre elas.

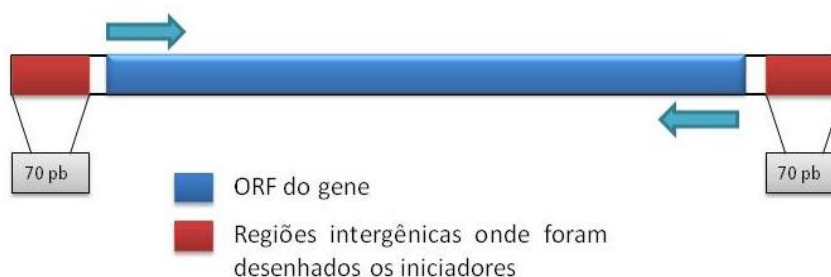


Figura 16: Esquema das regiões intergênicas e da ORF do gene de virulência

Em seguida, de posse das regiões alvo desejadas para desenho dos iniciadores, usamos a ferramenta PrimerQuest (IDTDNA - *Integrated DNA Technologies*: <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) com as seguintes configurações: (1) Temperatura de pareamento de 55 a 62° C; (2) porcentagem GC de 35 a 65%; (3) e tamanho do iniciador de 17 a 30 nt. Após submeter estas informações, o programa sugere conjuntos de possíveis iniciadores para a região desejada. Em seguida as características termodinâmicas para formação de dímeros e estruturas secundárias foram analisadas com auxílio da ferramenta Oligo Analyzer versão 3.1 do mesmo site já citado, disponível na URL (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), o *cutoff* para aceitar o desenho foi o delta G menor ou igual a -5 Kcal/mol. Os pares selecionados foram submetidos ainda à análise de

especificidade e desempenho usando a ferramenta *Primer* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Após estas diversas análises, os iniciadores foram ordenados para síntese.

4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras clínicas utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do estudo epidemiológico realizado por nosso grupo de pesquisa nos anos de 2007-2009, onde foram coletadas 1339 amostras de fezes de crianças com diarreia em hospitais públicos de Manaus (CEP 266/2006) (CRUZ et al., 2014). Dessas amostras 30 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Shigella*. A caracterização das amostras de *Shigella* foi realizada por metodologias clássicas e moleculares. Para a classificação dos isolados em nível de gênero foi realizado o sequenciamento de regiões variáveis do gene 16S rRNA e PCR de genes específicos que identifica gênero e espécies de *Shigella* segundo Ojha e colaboradores (2013).

Destas amostras foram utilizadas 15 cepas de *Shigella* spp, 10 *S. flexneri*, 4 *S. boydii* e a cepa *Shigella flexneri* 5a M90T como controle positivo. A descrição das amostras clínicas e suas respectivas espécies estão listadas na tabela

Tabela 3: Descrição das amostras selecionadas para o estudo

Amostras Clínicas	Código	Espécie
02	02a	<i>S. flexneri</i>
05	837	<i>S. flexneri</i>
06	97	<i>S. flexneri</i>
07	36P	<i>S. flexneri</i>
09	RP592	<i>S. flexneri</i>
11	192	<i>S. boydii</i>
14	183	<i>S. boydii</i>
15	113	<i>S. flexneri</i>
16	85	<i>S. flexneri</i>
17	80	<i>S. boydii</i>
26	202	<i>S. flexneri</i>
27	201	<i>S. flexneri</i>
27dzl		<i>S. boydii</i>
36	873	<i>S. flexneri</i>

4.3 REATIVAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE *Shigella*

As amostras foram reativadas em caldo LB (Luria Bertani) e em seguida semeadas em placas no meio Agar SS.

O DNA genômico foi extraído a partir de 3mL de culturas frescas, incubadas a 37° C durante 18 horas, sob agitação constante. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 90µL de tampão osmótico (1M Sorbitol, 50mM Tris-cl pH 7.5, 100mM EDTA). Foram adicionados 5 µL de Lisozima (10,5 mg/mL) e esta solução foi incubada na estufa a 37° C por 15 minutos. Foram adicionados 10 µL de 10% SDS, aquecendo a suspensão a 55° C em banho seco por 15 minutos. Para o *salting out* foi adicionado 5M acetato de potássio V/V, seguido de homogeneização e freezer -20° C por 15 minutos. Após esse período os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi recuperada e em tubos novos foi adicionado o mesmo volume (200µL) de isopropanol (gelado). A solução foi incubada novamente no freezer durante 15 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 80% (gelado). O resíduo de etanol foi evaporado no fluxo laminar em temperatura ambiente. O DNA foi reidratado com 30 µL de tampão TE buffer/RNase (10mM Tris-cl, pH 7,5, 1mM EDTA, 10µg/mL RNase).

4.4 CARACTERIZAÇÕES DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Os iniciadores referentes aos genes de virulência de *Shigella* foram confeccionados neste estudo (Tabela 02 e 03). Foi realizado a padronização das condições do PCR para os respectivos genes *Set1*, *Sen*, *IpaBCD* e *IpaHs* utilizando a cepa padrão *Shigella flexneri* 5a M90T.

As ampliações dos genes alvo foram realizadas com o conjunto de reagentes Platynum Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo), em volumes de reação de 25 µL, ajustada para as concentrações finais: 1x de tampão para PCR, 2,5µM de DNTPs, 0,2 µM de cada para de iniciadores, 1U de taq polimerase, 10 ng de DNA, 2 mM de MgCl₂ para os genes *IpaA*, *IpaH1* e *IpaH7.8*, 1,5mM de MgCl₂ para os genes *IpaB*, *IpaC*, *IpaD*, *IpaH3*, *IpaH4*, *IpaH5*, *IpaH6*, *IpaH7*, *IpaH1.4*, *IpaH2.5*, *IpaH4.5*, *IpaH9.8*, *Shet1* e *Shet2*. As ampliações foram realizadas em termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems by Thermo).

A reação de PCR em termociclador foi realizada nos seguintes passos: a desnaturação inicial foi de 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, 30 segundos para pareamento dos iniciadores, 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C. A temperatura de pareamento variou de acordo com o par de iniciadores (Tabela 3 e 4).

Para visualização das amplificações, 5 µL do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% em cubas horizontais, a 100 V, em tampão TBE 1x. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, o que possibilitou visualizar e fotodocumentar as amplificações sob luz ultravioleta.

4.5 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento gênico foi realizado para determinar as sequências dos genes de virulência de *Shigella*. Para isso, os produtos obtidos por amplificação de DNA foram purificados com o conjunto de reagentes PCR QIAquick® (Qiagen). O produto purificado foi submetido à reação de sequenciamento utilizando o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems by Thermo), segundo a reação: 0,5 µL do Mix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix), 2 µL de tampão (BigDye® Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer), 0,5 µM de cada iniciador, 50 ng de produto de PCR e H₂O ultrapura q.s.p para o volume final de 10 µL.

A ciclagem foi realizada utilizando o seguinte programa: 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, o produto foi submetido a purificação, realizado por precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio conforme descrito no protocolo do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As amostras foram enviadas secas em placas de 96 seladas e protegidas da luz para a central de sequenciamento do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM e as sequências foram determinadas com auxílio do Analizador Genético Automático de DNA, modelo ABI 3500 (Applied Biosystems by Thermo).

As sequências obtidas foram processadas usando o *pipeline* PHRED/CAP3, para análise de qualidade e montagem dos contigs. Os contigs e singlets obtidos foram comparados com as sequências depositadas nos principais bancos de sequência nucleotídica (nr, RefSeq) do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”: <http://www.ncbi.gov/BLAST>), usando-se o algoritmo BLAST, nas configurações BLASTn e BLASTx.

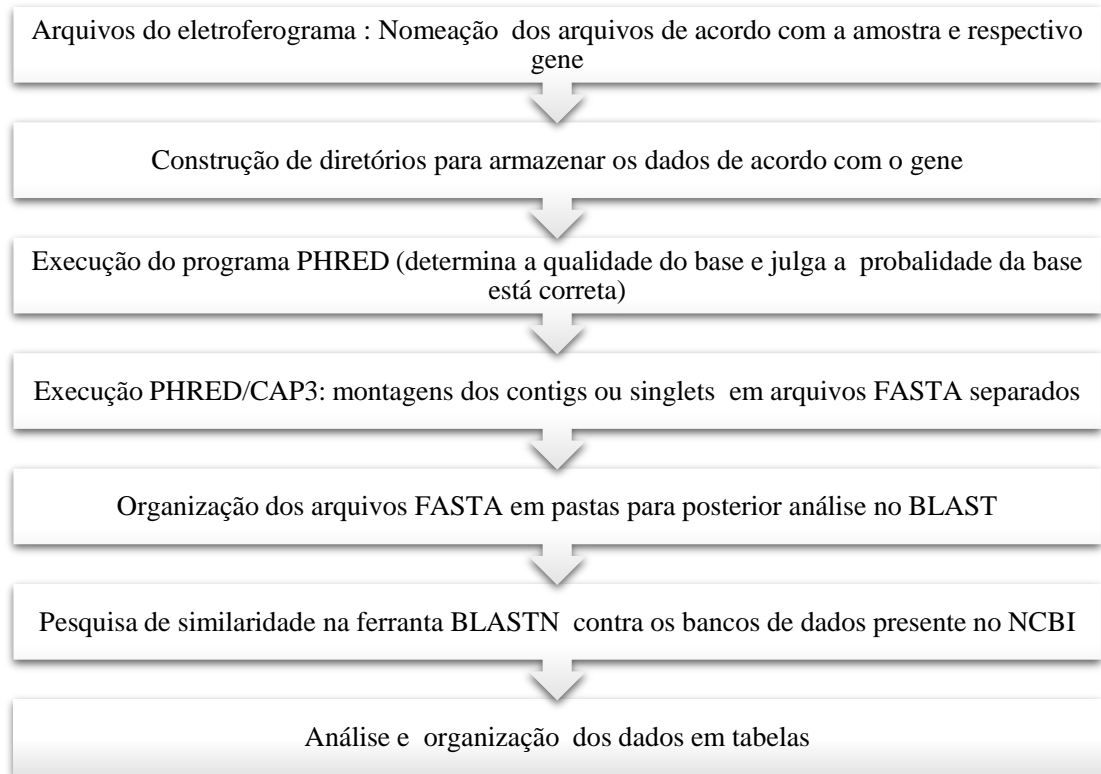


Figura 17: Fluxograma da análise *in silico* das sequências de nucleotídeo

5. RESULTADOS

5.1 ELABORAÇÕES E ANÁLISE *in silico* DOS INICIADORES

O programa gratuito PrimerQuest do site IDTDNA possui algoritmos que determinam qual o melhor par de iniciadores para amplificar um segmento de DNA, além de determinar alguns parâmetros que podem ser ajustados de acordo com as características desejáveis do usuário. A maioria dos parâmetros foi mantida nos padrões recomendados pelo site, porém alguns foram modificados. Os parâmetros modificados foram: (1) Temperatura de pareamento de 55 a 62° C; (2) porcentagem GC de 35 a 65%; (3) e tamanho do iniciador de 17 a 30 nt; (4) A concentração de MgCl₂ para 1.5 mM; e (5) a concentração de dNTP para 0.2 μM.

Para cada sequência sense ou anti-sense obteve-se 5 opções de iniciadores que o programa julgou mais adequado para a amplificação em questão, de acordo com os parâmetros fornecidos pelo usuário. Também forneceu algumas informações sobre os iniciadores como: a região que o iniciador reconhece no DNA-molde, o seu tamanho, a temperatura de pareamento e a porcentagem de GC. Após a obtenção dos iniciadores foi realizado a análise estrutural de cada iniciador (Fig 18).

GENE	Primer	Auto-dímero (ΔG)	Hetero-dímero (ΔG)	GC%	Tm $^{\circ}C$	Hairpin (ΔG)	Primer Blast
<i>Set1A</i>	FW	-4.01	-3.14	45.5	59.9	-0.29	OK
	RV	-3.61		58.8	62	-0.49	
<i>Set1B</i>	FW	-3.61	-4.38	45	59.2	-0.2	OK
	RV	-5.38		50	59.3	-0.4	
<i>SenA</i>	FW	-4.41	-3.07	52.6	60.4	-0.25	OK
	RV	-3.14		45	59.6	-0.56	
<i>SenB</i>	FW	-3.3	-4.67	47.6	59.8	-1.73	OK
	RV	-4.74		43.5	59.4	-1.44	
<i>IpaA</i>	FW	-3.65	-5.23	45	59.1	-1.16	OK
	RV	-3.61			59.4	-0.31	
<i>IpaB</i>	FW	-4.88	-3.9	36.4	60.1	-1.1	OK
	RV	-5.36		40.9	59.4	-0.36	
<i>IpaC</i>	FW	-1.6	-5.13	45	58.6	-1.6	OK
	RV	-3.17		45.5	59.3	-1.1	
<i>IpaD</i>	FW	-3.54	-3.53	38.1	59.3	-0.53	OK
	RV	-3.55		42.9	59.6	-1.51	
<i>IpaH1</i>	FW	-3.61	-3.89	47.4	59.2	-1.6	OK
	RV	-3.53			59.5	-0.35	
<i>IpaH2</i>	FW	-3.61	-4.67	50	58.2	-0.8	OK
	RV	-3.61		42.9	58.1	-0.9	
<i>IpaH3</i>	FW	-3.14	-3.55	45	59.2	-2.05	OK
	RV	-3.61		42.9	59.4	-0.7	
<i>IpaH4</i>	FW	-3.61	-3.89	50	58.9	-0.12	OK
	RV	-3.61		42.9	59.4	-0.33	
<i>IpaH5</i>	FW	-3.61	-3.61	52.9	59.2	-0.56	OK
	RV	-3.61		47.4	59	-0.9	
<i>IpaH6</i>	FW	-3.53	-5	45	58.3	-0.14	OK
	RV	-3.61			58.8	-0.4	
<i>IpaH7</i>	FW	-3.61	-4.74	50	59.1	-0.9	OK
	RV	-3.53		47.4	59	-0.2	
<i>IpaH1.4</i>	FW	-3.61	-4.41	50	58.7	-0.12	OK
	RV	-3.65		42.9	59	-0.35	
<i>IpaH2.5</i>	FW	-3.14	-4.38	45	58.9	-0.6	OK
	RV	-4.87			59.2	-1.3	
<i>IpaH4.5</i>	FW	-5.38	-5.37	45.5	59.8	-1	OK
	RV	-1.95		40.9	59.1	-1.9	
<i>IpaH7.8</i>	FW	-3.61	-5.36	33.3	56.7	-1.5	OK
	RV	-3.61		45	57.2	-0.5	
<i>IpaH9.8</i>	FW	-5.47	-5.02	42.9	59.2	-0.81	OK
	RV	-3.91		58.8	58.2	-0.22	

Figura 18: Quadro da análise dos iniciadores no programa Oligo Analyser.

5.2 SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES

Os iniciadores foram desenvolvidos para amplificação de genes de virulência e análise da variabilidade genética de cepas selvagens de *Shigella*. Os genes de virulência de *Shigella* foram divididos em genes cromossomais (9) e plasmidiais (11) e estão descritos nas **Tabelas 04 e 05** respectivamente.

Tabela 4: Lista dos genes cromossomais e iniciadores que foram desenvolvidos para o estudo.

GENE	INICIADORES		AMPLICON (pb)	Ta (°C)	Tam. GENE (pb)
	SENSE	ANTI-SENSE			
<i>Set1A</i>	CAGTGTGATATGGCTGTTATCC	TGATTACGGGGCGGTGA	643	59	534
<i>Set1B</i>	ACTGTCATAAGCGTCAATCC	GTTATCCATGCCTCCATCAG	357	59	186
<i>IpaH 1</i>	AGAAGACCGCTTTGCTTAC	TCTGAAACACCCTCCTCAT	2049	59	1827
<i>IpaH 3</i>	CTGCTGAAGGGAACCAATAA	CTGAACAGAGAAACGGATGAA	1925	59	1750
<i>IpaH 4</i>	GCACAGGCGAGACATTTA	CTGAACAGAGAAACGGATGAA	1902	59	1644
<i>IpaH5</i>	TAGCACAGGCGAGACAT	GAACAGGGAAACGGATGAA	1902	59	1644
<i>IpaH 6</i>	CTGAAACACCCTCCTCATT	CTGAACAGAGAAACGGATGA	1986	58	1827
<i>IpaH 7</i>	AAGACCGCTTTGCTTACC	ATTGAGCCAGAACTTCACC	2065	59	1764

Tabela 5: Lista dos genes plasmidiais e iniciadores que foram desenvolvidos para o estudo.

GENE	INICIADORES		AMPLICON (pb)	Ta (°C)	Tam. GENE (pb)
	SENSE	ANTI-SENSE			
<i>SenA</i>	GGTAACAGACCAGACGGTT	ATCATCCAAAGGGCAAAGAG	1838	59	1698
<i>SenB</i>	CTACACCTTGTGGAGTGAAC	CTCGCTATCTTATAGGAGCATTC	1878	59	1710
<i>IpaA</i>	CAGATAGTTTGCTGTACGCT	TTCTCTGCCGAAGATGAAAC	2133	60	1902
<i>IpaB</i>	TCGGAAGAACTTTGAGTTTGTT	CAATCATACTTGGACGCAATTC	1883	59	1743
<i>IpaC</i>	GACTGAATGATGAGGTGGAA	CCAACCTCTCAGGCTAATAGAAC	1272	59	1092
<i>IpaD</i>	ATGATGGTGAAGTTGCCTTAT	CAGTCAGATTGCTGGTAACAT	1149	59	999
<i>IpaH1.4</i>	CGGAACAACTGACCATCTC	GAAAGGGTACAAAGCAAACCTG	1880	59	1728
<i>IpaH2.5</i>	GGAAGCAATACCTGGAGAAA	GTCATATTCGCCCTGACTTT	1929	59	1692
<i>IpaH4.5</i>	GGTCACATTAACATGGGTAGAC	AGTCATCCTGTTTACCTCTTTC	1955	59	1725
<i>IpaH7.8</i>	TATCGGAAATGGTAAGTGA	GGTATTGAGCGAGGATTTAC	1878	56	1698
<i>IpaH9.8</i>	GTGCTGAAGTTCATTTATGG	CGTCACCAGGATATGCC	1890	58	1695

5.3 AMOSTRAS BACTERIANAS

As 14 cepas clínicas deste estudo foram selecionadas a partir de 30 amostras de *Shigellas* provenientes de um estudo epidemiológico realizado entre os anos 2007 e 2009 na

cidade de Manaus (CRUZ et al., 2014). Destas amostras foram utilizadas 15 cepas de *Shigella* spp, 10 *S. flexneri*, 4 *S. boydii* e a cepa *Shigella flexneri* 5a M90T como controle positivo.

5.4 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA total de *Shigella* foi extraído segundo o protocolo desenvolvido por Mota et al., (2009), com algumas modificações. A extração mostrou-se eficiente, uma vez que não degradou o DNA; Na quantificação em gel podemos observar um DNA integro com bandas definidas (Fig. 19A), e na quantificação por espectrometria usando o NanoDrop, verificamos que a razão A260/280 apresentou um grau de pureza adequado. Após esses passos, fizemos a avaliação da funcionalidade do DNA, através da amplificação do gene 16S específico de bactéria (Fig.19B). As amostras de DNA que passaram por esses critérios se apresentaram viáveis para amplificação por PCR.

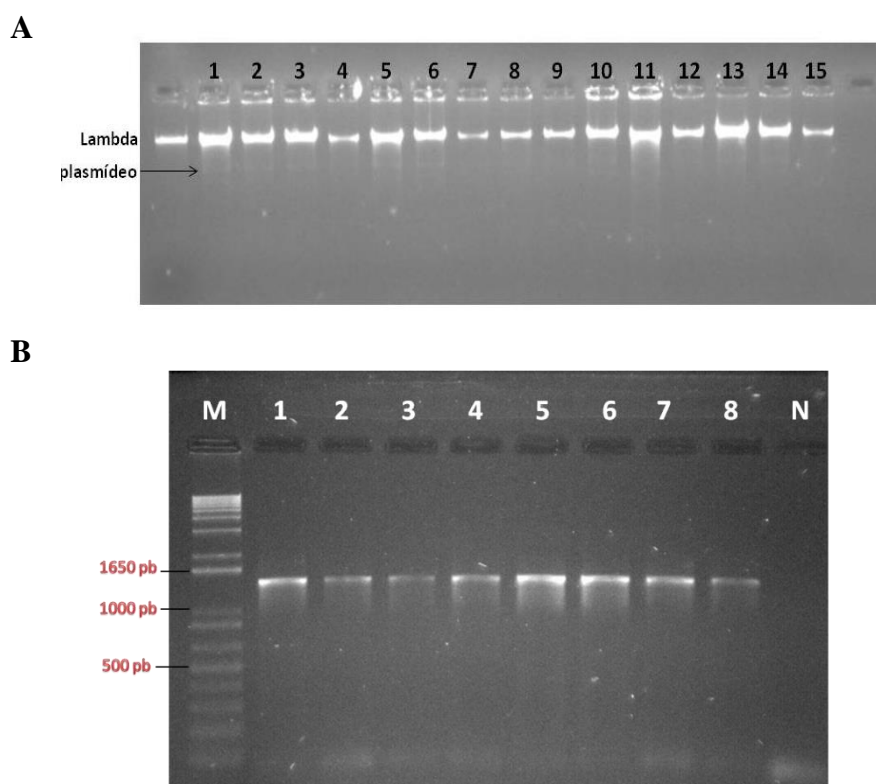


Figura 19: Gel 1% da extração do DNA total e da amplificação do gene 16S. Em A) Extração do DNA total; 1: Lambda (10 ng/μL); De 2 a 14: produtos das extrações das amostras clínicas de *Shigella* ; 16: extração da cepa padrão *Shigella flexneri* 5a M90T; Em B) amplificação do gene 16S com algumas amostras de DNA extraídas; M: Marcador molecular de 1000 pb (1kb plus DNA Ladder – Invitrogen); 1 a 8: amplificação de gene 16S (1500 pb); N: controle negativo.

5.5 PADRONIZAÇÕES DOS INICIADORES

Resultado da amplificação e padronização dos 20 pares de iniciadores referente aos genes de virulência de *Shigella* spp. utilizando a cepa padrão *Shigella flexneri* 5a M90T (controle positivo).

A parti do protocolo padrão foi realizado à amplificação inicial dos genes. Vários parâmetros foram testados, como a concentração inicial dos iniciadores (0,2 a 0,5 μM), do MgCl_2 (1 a 2 mM) e da temperatura de anelamento (Fig 20).

Componentes da reação de PCR	Volume de uma reação (μL)	Conc. Final
Água Miliq	17,875	
Tampão 10x	2,5	1x
MgCl_2 (50 mM)	0,75 / 1	1,5 / 2 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	0.2 mM ou 200 μM
Primer Fw (10 mM)	0,5	0.2 μM
Primer Rv (10 mM)	0,5	0.2 μM
Taq 5U	0,125	1U
DNA	2	10 ng/ μL
Volume Final	25	

Figura 20: **Quadro das Concentrações dos reagentes da PCR utilizados para amplificação dos genes**

Após vários testes de otimização das reações da PCR, as concentrações dos reagentes, condições da ciclagem, e temperatura de anelamento de cada iniciador foi estabelecida (anexo 1). A padronização e amplificação dos genes utilizando os iniciadores *IpaA*, *IpaB*, *IpaC* e *IpaD* são mostrados na figura (21-A), onde podemos observar a ausência de bandas inespecíficas, de dímeros ou sobra dos iniciadores, destacando a especificidade e eficiência na amplificação dos genes alvos.

A padronização e amplificação dos genes referentes aos iniciadores *IpaH1* ao *IpaH7* (cromossomo), e *IpaH1.4*, *IpaH2.5*, *IpaH4,5* (plasmídeo), são mostrados na figura (21-B). Onze dos doze genes *IpaH* (*IpaH7.8* e *IpaH9.8*, resultado não mostrado) foram amplificados e padronizados com êxito, sem bandas inespecíficas, sem dímeros de iniciadores ou sobra de reagentes, porém um par de iniciador referente ao gene *IpaH2* (fig.21-B, Num.2) apresentou bandas inespecíficas, mesmo depois das alterações na concentração dos reagentes e nos testes com temperaturas variadas, o que o impossibilitou de ser utilizado no estudo.

A padronização dos genes referentes às enterotoxinas Shet2 e Shet1 são mostrados na figura (21-A e B), respectivamente. A figura C compõe os testes de diferentes concentrações dos iniciadores em diferentes temperaturas do gene *SenA*, já a figura D, demonstra a padronização dos genes *SetIA* (1,2,3 e N) e *SetIB* (4,5,6,e N) em diferentes concentrações dos iniciadores. A enterotoxina Shet1A é predominantemente encontrada em *Shigella flexneri* sorotipo 2a, e raramente em outros sorotipos. A cepa padrão *Shigella flexneri* 5a M90T (controle positivo) não apresenta os genes que codificam para essa enterotoxina, então utilizamos a cepa clínica 27 como controle positivo, já que em estudos anteriores com essa amostra foi detectado a presença dos genes que codificam para a enterotoxina Shet1.

Os 19 pares de iniciadores foram otimizados, garantindo a especificidade na amplificação das sequências-alvo. No gel de agarose podemos observar os fragmentos de tamanhos correspondentes aos amplificados pelos iniciadores no PCR *in silico* (Fig. 21).

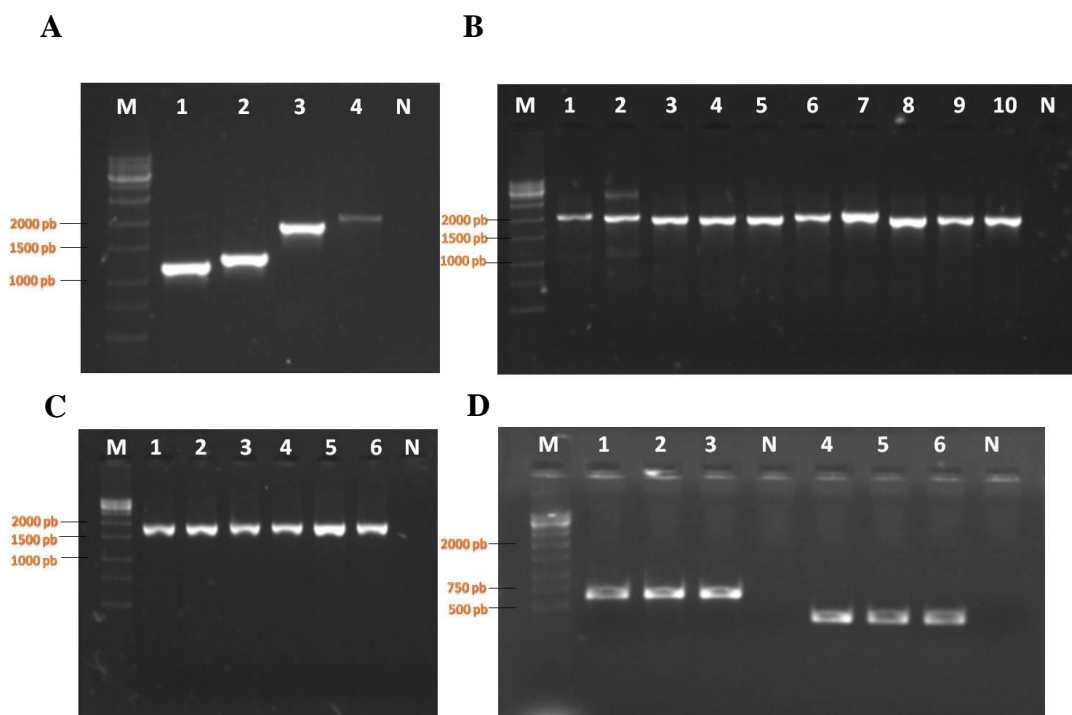


Figura 21: Amplicons das padronizações dos iniciadores com a cepa padrão de *Shigella*. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. M: Marcador molecular de 1000 pb (1kb – Ludvig); N: controle negativo (sem DNA); Em A) 1- Gene *IpaD* (1149pb); 2- Gene *IpaC* (1272pb); 3- Gene *IpaB* (1883pb); 4- Gene *IpaA* (2133pb). B) 1- Gene *IpaH1* (2049pb); 2- Gene *IpaH2* (1970 pb); 3- Gene *IpaH3* (1925pb); 4- Gene *IpaH4* (1902pb); 5- Gene *IpaH5* (1902 pb); 6- Gene *IpaH6* (1986 pb); 7- Gene *IpaH7* (2065 pb); 8- Gene *IpaH1.4* (1880 pb); 9- Gene *IpaH2.5* (1929 pb); 10- Gene *IpaH4.5* (1955 pb). C) Diferentes concentrações dos iniciadores em diferentes temperaturas de anelamento do gene *SenA* (1838 pb). D) Amplificação dos genes *SetIA* e *SetIB* com a cepa clínica 27 em triplicata; 1,2,3 gene *SetIA* (643 pb); 4,5,6 gene *SetIB* (347 pb).

5.6 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Após a determinação da temperatura de anelamento e das concentrações dos reagentes da reação de PCR, foi realizado a amplificação dos genes alvos com as cepas clínicas de *Shigella*. Foram utilizadas 14 cepas clínicas de *Shigella* spp.

Os genes codificados pelo *operon Ipa* são responsáveis pela capacidade invasiva da *Shigella*. Entre eles temos, os genes *IpaA*, *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*, todos presentes no plasmídeo de invasão, são comumente encontrados em espécies de *Shigella*; codificam os efetores responsáveis pelo fenótipo invasivo de *Shigella* nas células epiteliais. Os genes *IpaC*, *IpaD* e *IpaA* foram amplificados em 100% das cepas estudadas. Enquanto que, o *IpaB* amplificou em 71,4% (10/14) das amostras.

Na figura 22, podemos observar os géis das amplificações dos genes *IpaA*, *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*, respectivamente.

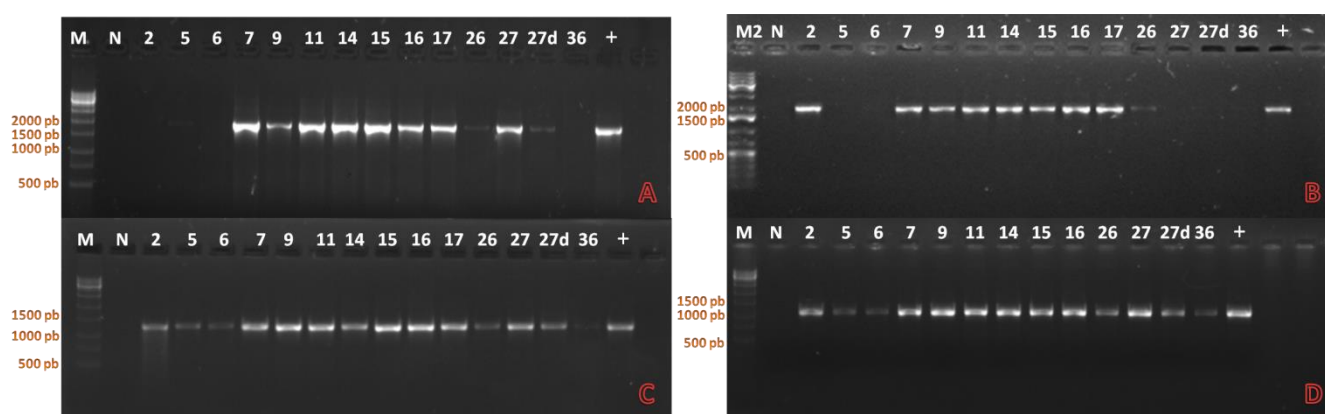


Figura 22: Imagens da amplificação dos genes *Ipas*. Géis á 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador molecular 1000 pb (1kb-Ludvig); M2: marcador molecular 1000 pb (1kb plus - GeneRuler); N: controle negativo (sem DNA); +: controle positivo (*Shigella flexneri* 5a M90T); Números: identificação das cepas clínicas utilizadas no estudo (2 a 36). A) Foto da amplificação do gene *IpaA* (2133 pb); B) Foto da amplificação do gene *IpaB* (1883 pb); C) Foto da amplificação do gene *IpaC* (1272 pb); D) Foto da amplificação do gene *IpaD* (1149 pb).

O gene *IpaH* é um importante fator de virulência, é responsável pela modulação da resposta imune do hospedeiro, e pode estar presente tanto no cromossomo como no plasmídeo de virulência. As cepas clínicas de *Shigella* podem apresentar até sete cópias do gene *IpaH* no cromossomo e até cinco cópias no plasmídeo. Na figura 23 podemos observar a amplificação dos genes *IpaH* presente no cromossomo, respectivamente *IpaH1* (A), *IpaH3* (B), *IpaH4* (C), *IpaH5* (D), *IpaH6* (E) e *IpaH7* (F).

Todas as 14 amostras de *Shigella* tiveram 100% de amplificação para as genes *IpaH1*, *IpaH3*, *IpaH4*, *IpaH5*, *IpaH7*, enquanto que, para o gene *IpaH6* cerca de 12 (85,7%) amostras tiveram amplificação positiva.

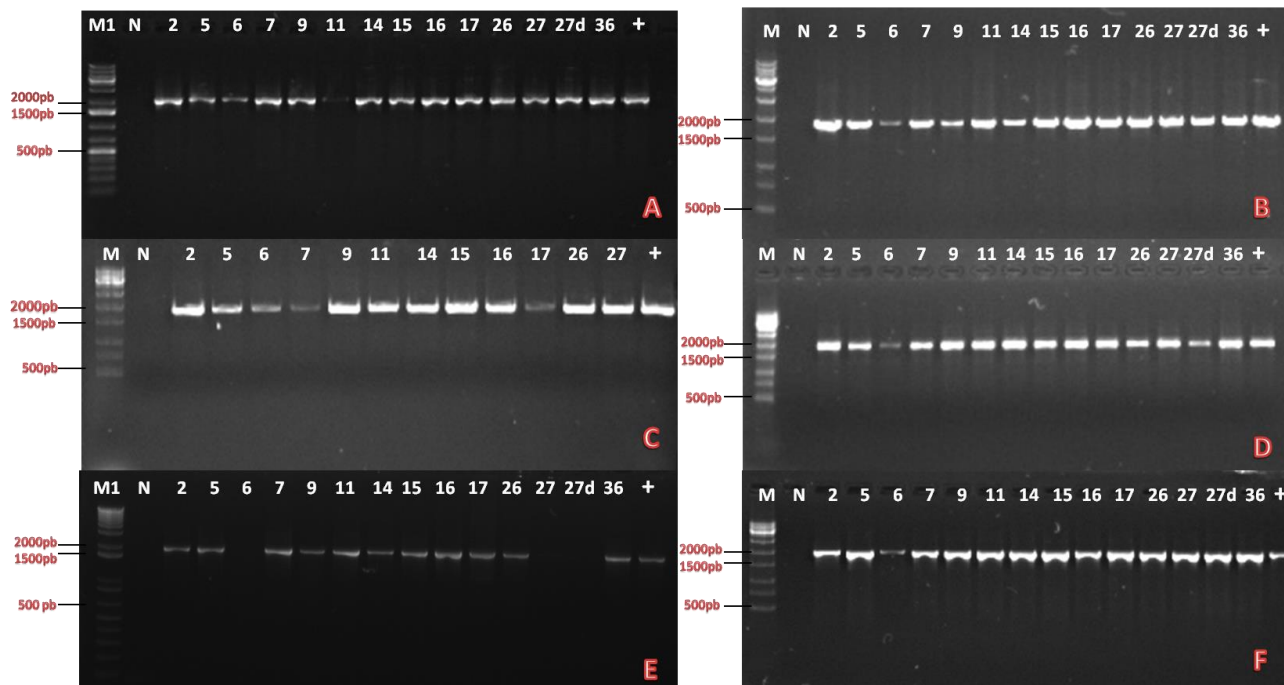


Figura 23: Imagens das amplificações da família multigênica *IpaH*. Géis á 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador molecular 1000 pb (1kb-Ludvig); M1: marcador molecular 1000 pb (1kb plus - GeneRuler); N: controle negativo (sem DNA); +: controle positivo (*Shigella flexneri* 5a M90T); Números: identificação das cepas clínicas utilizadas no estudo (2 a 36). A) Foto da amplificação do gene *IpaH1* (2049 pb); B) Foto da amplificação do gene *IpaH3* (1925 pb); C) Foto da amplificação do gene *IpaH4* (1902 pb); D) Foto da amplificação do gene *IpaH5* (1902 pb); E) Foto da amplificação do gene *IpaH6* (1986 pb); F) Foto da amplificação do gene *IpaH7* (2065 pb).

Na figura 24 podemos observar a amplificação dos genes *IpaH* presente no plasmídeo, na ordem a seguir *IpaH1.4* (A), *IpaH2.5* (B), *IpaH4.5* (C), *IpaH7.8* (D) e *IpaH9.8* (E). Os genes *IpaH1.4* e *IpaH4.5* tiveram a amplificação de 100% (14/14) das cepas estudadas, já o gene *IpaH7.8* teve amplificação positiva em 11(78,5%) cepas clínicas. Quase todas as cepas foram positivas para o gene *IpaH9.8*, tendo uma amplificação em 12 (85,7%) cepas, em comparação com o gene *IpaH2.5* que teve uma amplificação de apenas 51,8% (8/14).

As enterotoxinas são fatores de virulência envolvidos na diarreia aquosa causada por *Shigella*. A enterotoxina Shet1 é codificada por dois genes, o *Set1A* e *Set1B*, presente no cromossomo, enquanto que, a enterotoxina Shet2 é codificada apenas pelo gene *Sen*, presente no plasmídeo. A figura 25, demonstra a amplificação do gene *SenA* e do gene *Set1B* nas cepas

clínicas de *Shigella*. Os genes *SenA* e *SenB* amplificaram em todas as cepas de *Shigella* (100%), enquanto que, os genes *Set1A* e *SetB* em 13 (92,8%).

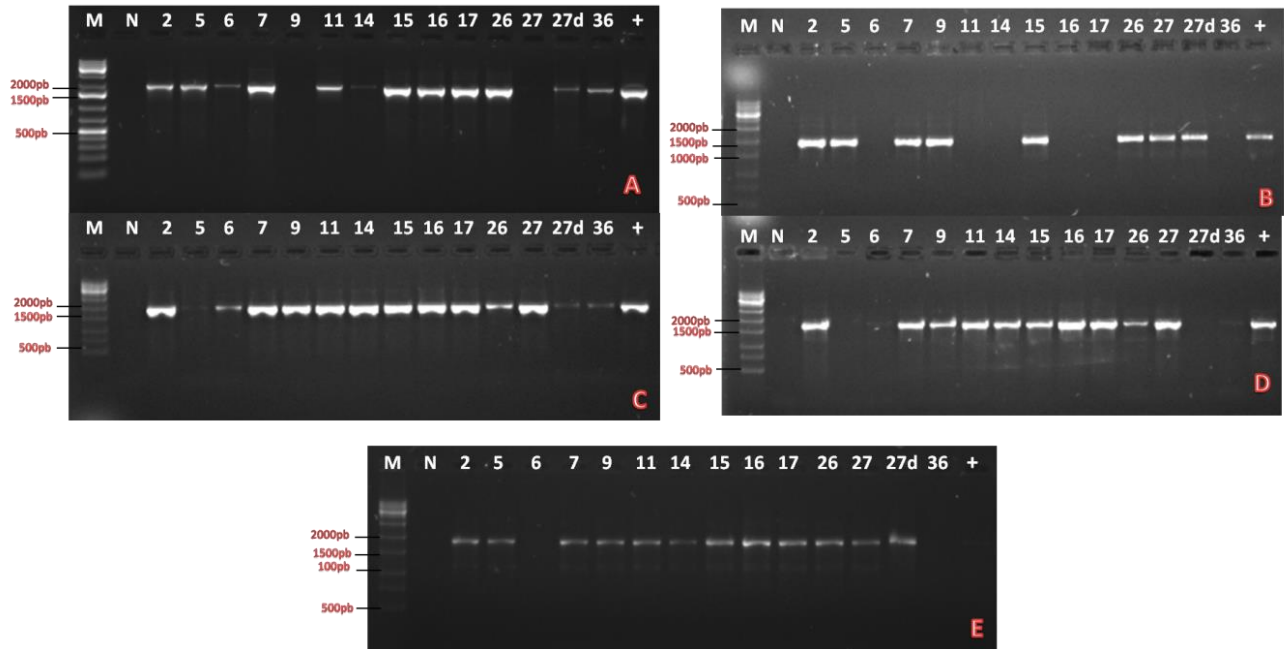


Figura 24: Imagens das ampliações da família multigênica *IpaH* do plasmídeo. Géis á 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador molecular 1000 pb (1kb-Ludvig); M1: marcador molecular 1000 pb (1kb plus - GeneRuler); N: controle negativo (sem DNA); +: controle positivo (*Shigella flexneri* 5a M90T); Números: identificação das cepas clínicas utilizadas no estudo (2 a 36). A) Foto da amplificação do gene *IpaH1.4* (1880 pb); B) Foto da amplificação do gene *IpaH2.5* (1929 pb); C) Foto da amplificação do gene *IpaH4.5* (1955 pb); D) Foto da amplificação do gene *IpaH7.8* (1878 pb); E) Foto da amplificação do gene *IpaH9.8* (1890 pb).

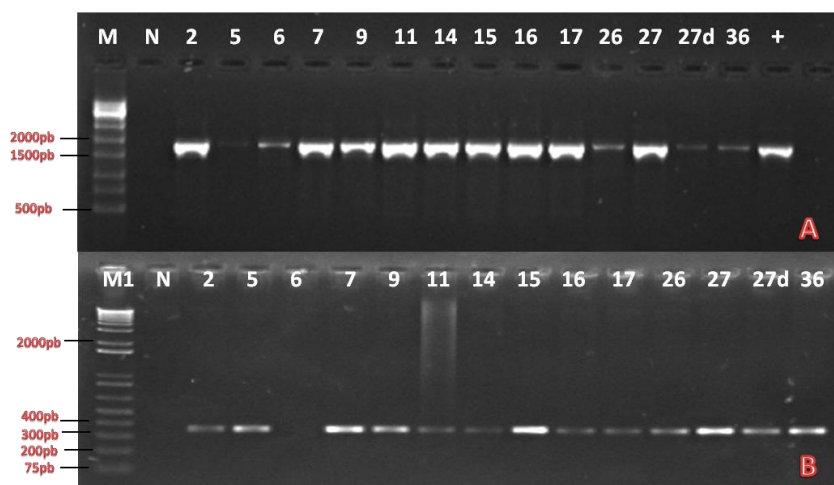


Figura 25: Imagens das ampliações dos genes que codificam para as enterotoxinas *Shet1* e *Shet2*. Géis á 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador molecular 1000 pb (1kb-Ludvig); M1: marcador molecular 1000 pb (1kb plus - GeneRuler); N: controle negativo (sem DNA); +: controle positivo (*Shigella flexneri* 5a M90T); Números: identificação das cepas clínicas utilizadas no estudo (2 a 36). A) Foto da amplificação do gene *SenA* (1838 pb); B) Foto da amplificação do gene *Set1B* (357 pb).

Tabela 6: Presença e ausência dos genes de virulência nas cepas clínicas de *Shigella* spp.

CEPAS CLÍNICAS	GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>Shigella</i>																		
	<i>IpaA</i>	<i>IpaB</i>	<i>IpaC</i>	<i>IpaD</i>	<i>IpaH1</i>	<i>IpaH3</i>	<i>IpaH4</i>	<i>IpaH5</i>	<i>IpaH6</i>	<i>IpaH1.4</i>	<i>IpaH2.5</i>	<i>IpaH4.5</i>	<i>IpaH7.8</i>	<i>IpaH9.8</i>	<i>IpaH7</i>	<i>Set1A</i>	<i>Set1B</i>	<i>SenA</i>	<i>SenB</i>
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
26	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
27dzl	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
36	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ Amplificação positiva dos genes de virulência; ■ Ausência da amplificação do gene de virulência.

5.7 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

Um total de 474 sequências referentes aos 19 genes de virulência de *Shigella* foram sequenciadas. As sequências foram analisadas e processadas para remoção de sequências de baixa qualidade no *pipeline* PHRED/CAP3. Foi atribuído um valor de qualidade do Phred maior que 20 a cada 100 pares de bases (o que caracteriza 1 erro a cada 100 pb) para exclusão de sequências de baixa qualidade. Após essa triagem as sequências com a qualidade aceitável foram processadas para formação de contigs e singlets.

O número das sequências de cada gene variou de acordo com a amplificação nas cepas clínicas por PCR. A quantidade de amostras clínicas sequenciadas de cada gene está descrita na tabela 07 e 08. Das 474 sequências analisadas, 154 apresentavam o valor de qualidade dentro do proposto, e estavam distribuídas entre 12 genes de virulência. Após a triagem as 154 sequências foram processadas no programa CAP3, destas foram obtidas 134 sequências únicas (singlets) e 20 sequências contíguas (cada uma contendo 2 sequências) As sequências de boa qualidade seram posteriormente depositadas no banco de dados do NCBI.

A ORF de cada gene foi analisada de acordo com o tamanho e qualidade dos fragmentos obtidos no sequenciamento. Os tamanhos dos fragmentos variaram, sete genes apresentaram sequências únicas em ambas as extremidades da ORF (Fig. 26-B); Outros quatro genes tiveram sequências únicas na extremidade 5' ou na extremidade 3' da ORF (Fig. 26-C e D). Apenas dois genes formaram contigs em todas as amostras, ou seja, as sequências sense e anti-sense se alinharam formando uma só sequência (Fig.26-A).

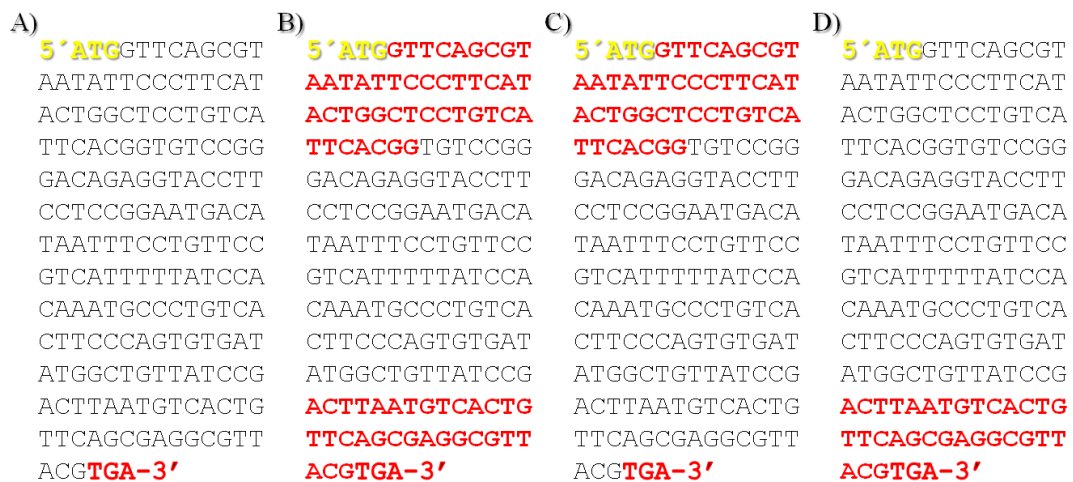


Figura 26: Representação esquemática da análise das sequências dos genes de virulência. A) Análise completa da sequência dos genes; B) Análise da extremidade 5' e 3' das sequências dos genes; C e D), Análise da extremidade 5' e 3' das sequências dos genes.

No resultado do sequenciamento dos genes de invasão, apenas as sequências do *IpaD* e *IpaB* foram analisadas quanto a presença de polimorfismo. Estes tiveram sequências de boa qualidade em ambas as extremidades, porém, apenas o *IpaD* que tem 999pb formou contig, ou seja, o gene completo foi analisado. O gene *IpaB* apresenta 1743 pb, destas foi possível analisar cerca de 250 pb na região 5' e 600 pb na região 3'.

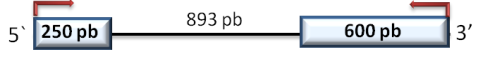


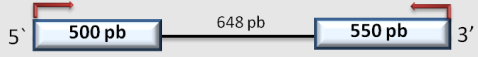
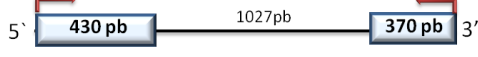
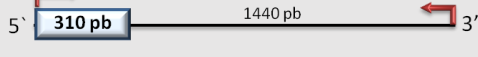
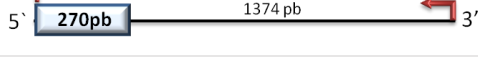
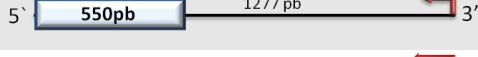

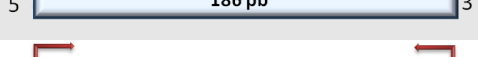
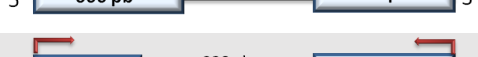
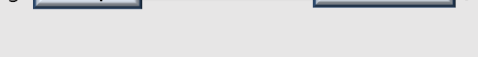
Dos 11 genes *IpaHs* sequenciados, apenas 7 tiveram sequências de boa qualidade. Dos que obtiveram sequências na extremidade 5' e 3' temos: o *IpaH2.5* que tem cerca de 1692 pb, sendo que, foi analisado cerca de 560 pb na região 5' e 550 pb na região 3'; o gene *IpaH7.8* que possui 1698 pb foi analisado cerca de 500 pb na região 5' e 550 pb na região 3'; já o *IpaH1* com contém 1827 pb foi analisado cerca de 430 pb na região 5' e 370 pb na região 3'. Os genes *IpaHs* que apresentaram fragmentos em apenas uma extremidade da ORF são: o gene *IpaH3* (1750 pb) que teve sequências de 310 pb na região 5'; o gene *IpaH4* (1644 pb) apresentou sequências de 270 pb na região 5'; O *IpaH6* (1827 pb) teve fragmentos de 550 pb na região 5' e o *IpaH7* (1764) que apresentou fragmentos de 600 pb na região 3'. Os genes *IpaHs* apresentaram apenas sequências únicas e foram analisadas e comparadas individualmente.



Os genes *Set1A*, *Set1B*, *SenA* e *SenB* foram sequenciados. Apenas o *Set1A* não apresentou sequências de boa qualidade e não foi possível analisar a variabilidade genética. Os três genes restantes tiveram sequências de boa qualidade em ambas as extremidades da ORF. O gene *SenA* que tem 1698 pb, foi obtido cerca de 600 pb na região 5' e 500 pb na região 3' e o gene *SenB* que possui cerca de 1710 pb, foi analisado cerca de 330 pb na região 5' e 450 pb na região 3'. O gene *Set1A* tem 186 pb na sua ORF e todas as amostras sequenciadas tiveram uma boa qualidade e formaram contigs, possibilitando a análise do gene completo.

As sequências de boa qualidade serão depositadas no banco de dados do NCBI.

Os esquemas do tamanho do fragmento e o local analisado (extremidade 5' e 3' da ORF), e a região interna do gene que não foi sequenciada são mostrados na tabela 07.

Tabela 7: Descrição do total dos fragmentos sequenciados de cada gene, resultado e esquemas das regiões analisadas de cada um.

Gene	Amostras sequenciadas (5' - 3')*	Total de Sequências de qualidade	Sequências Únicas	Contigs	Região analisada da ORF do gene
<i>IpaB</i>	10	13	13	-	5'  3'
<i>IpaD</i>	10	11	3	8	5'  3'
<i>IpaH2.5</i>	8	10	10	-	5'  3'
<i>IpaH7.8</i>	11	11	11	-	5'  3'
<i>IpaH1</i>	14	20	20	-	5'  3'
<i>IpaH3</i>	14	8	8	-	5'  3'
<i>IpaH4</i>	13	8	8	-	5'  3'
<i>IpaH6</i>	10	16	16	-	5'  3'
<i>IpaH7</i>	14	10	10	-	5'  3'
<i>Set1B</i>	12	12	-	12	5'  3'
<i>SenA</i>	14	21	21	-	5'  3'
<i>SenB</i>	14	14	14	-	5'  3'
Total	144 x 2 = 288	154	134	20	

Legenda: As amostras foram sequenciadas em ambas as extremidade 5' e 3' (ex: 10 amostras = 10 sequências sense + 10 anti-sense).  Região e quantidades de bases de nucleotídeos que foram analisados.  Região do gene e quantidade de bases de nucleotídeo que não foi sequenciada ou que não foi possível analisar.

As sequências de 6 genes de virulência tiveram uma baixa qualidade, o que inviabilizou a pesquisa de polimorfismo, porém a análise de uma região curta do gene na ferramenta BLASTn, possibilitou a identificação do respectivo gene – alvo (Tabela 08).

Tabela 8: Sequências de baixa qualidade e seus respectivos genes

Gene	Amostras sequenciadas*	Total de sequências de baixa qualidade
<i>IpaA</i>	10	20
<i>IpaC</i>	14	28
<i>IpaH1.4</i>	14	28
<i>IpaH4.5</i>	14	28
<i>IpaH9.8*</i>	14	-
<i>IpaH5</i>	14	28
<i>Set1A</i>	13	26
Total	93 x 2 = 186	158

* Números indicam as amostras foram sequenciadas em ambos os sentidos sense e anti-sense (ex: 10 amostras = 10 sequências sense + 10 anti-sense).

* *IpaH9.8* não teve sequências.

As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI usando a ferramenta BLASTN (Anexo 2). A partir do alinhamento local verificamos a similaridade entre as sequências anotadas contra as de cada gene (individualmente). Todas as 154 sequências dos 12 genes de virulência tiveram 99% ou 100% de identidade, sendo que a primeira entrada sempre correspondia o organismo de interesse e o respectivo gene – alvo (Tabela 09). As sequências que apresentaram 99% de identidade foram analisadas individualmente para identificação de variantes de nucleotídeo. A análise da mudança de base também foi verificada no seu respectivo eletroferograma, e fim de confirmar o nucleotídeo modificado e se o pico estava definido.

Após a identificação das mutações nos genes, foi feita uma análise mais detalhada dessas alterações. As sequências dos genes que apresentaram mutações foram submetidas ao programa BLASX do NCBI, para verificar se a mudança do nucleotídeo resultou na alteração o aminoácido na proteína.

Tabela 9: Resultado da análise no programa BLATN

Gene	Total de Sequencias de qualidade	Blastn	Query	Espécie	Presença de variantes de Nucléotídeo
<i>IpaB</i>	13	100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	-
<i>IpaD</i>	11	99% / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	+
<i>IpaH2.5</i>	10	99% / 100%	100%	<i>S. flexneri</i>	+
<i>IpaH7.8</i>	11	99% / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	-
<i>IpaH1</i>	20	99% / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	-
<i>IpaH3</i>	8	99% / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	+
<i>IpaH4</i>	8	99% / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	-
<i>IpaH6</i>	16	99% / 100%	100%/	<i>Shigella</i> spp.	+
<i>IpaH7</i>	10	100%	100%	<i>S. flexneri</i>	-
<i>Set1B</i>	12	100%	100%	<i>S. flexneri</i>	-
<i>SenA</i>	21	99% / 100%	100%	<i>S. flexneri</i>	+
<i>SenB</i>	14	99 / 100%	100%	<i>Shigella</i> spp.	-

5.8 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Neste estudo foram identificadas 9 mutações de ponto em 5 genes de virulência de *Shigella*, sendo eles, o gene *IpaD*, *SenA*, *IpaH3*, *IpaH2.5* e *IpaH6*.

No gene *SenA* foi identificada uma mutação de substituição de base na amostra 17, posição 83 da sequência do nucleotídeo de C > T. Essa substituição de transição gerou uma mutação *missense* (Tre -> Ile) na sequência do aminoácido da proteína.

No gene *IpaH3* foram identificadas 3 substituições de bases distribuídas entre 7 amostras de *Shigella*. Nas amostras 2, 9, 15 e 27 foi identificada uma substituição de transição na posição 79 de A > G (Fig. 27-A). Nas amostras 14 e 16 foi encontrada uma substituição de transição na posição 309 de G > A (Fig. 27-B). Já na amostra 17 foi identificada uma transversão na posição 366 de C > A. Essas substituições resultaram em 2 mutações *missense* (Lys -> Glu; Asn -> Lys) e em 1 mutação silenciosa (Gln -> Gln) na sequência da proteína do *IpaH3*. A figura 27-A e B representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor dos nucleotídeos do gene *IpaH3* das amostras de *Shigella*, e mostra a região em que foi identificado as alterações.

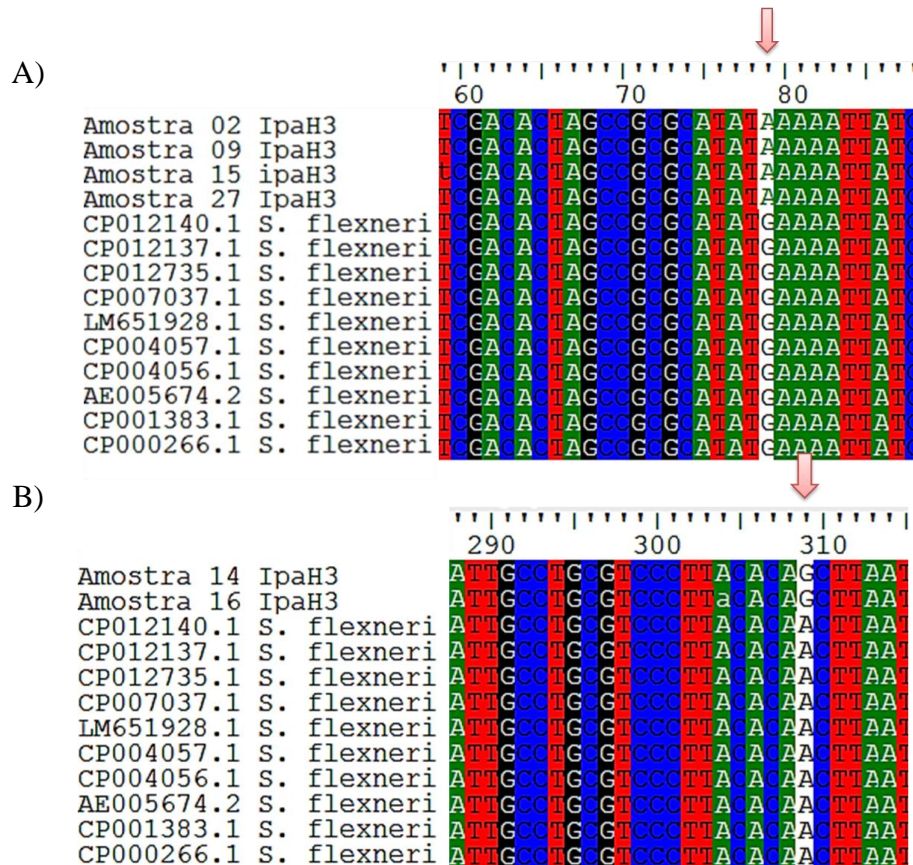


Figura 27: Alinhamento das seqüências de nucleotídeo no programa BioEdit. A) Substituição de base de A->G nas amostras 2, 9, 15 e 27 encontrada no gene *IpaH3*. B) Substituição de base de G -> A nas amostras 14, 16 encontrada no gene *IpaH3*. As setas indicam aonde ocorreram às variações nucleotídicas nas amostras de *Shigella*.

O gene *IpaH6* apresentou uma única substituição na amostra 11, especificamente na posição 481 de A > G (Fig 28). Essa transição não causou alteração na seqüência de aminoácido e também foi classificada como mutação silenciosa. O gene *IpaH2.5* teve uma substituição de base nas amostras 2 e 9, essa substituição foi identificada na posição 195 de G > A, porém, na seqüência de aminoácido essa substituição não gerou nenhuma mudança, sendo classificada como mutação silenciosa.

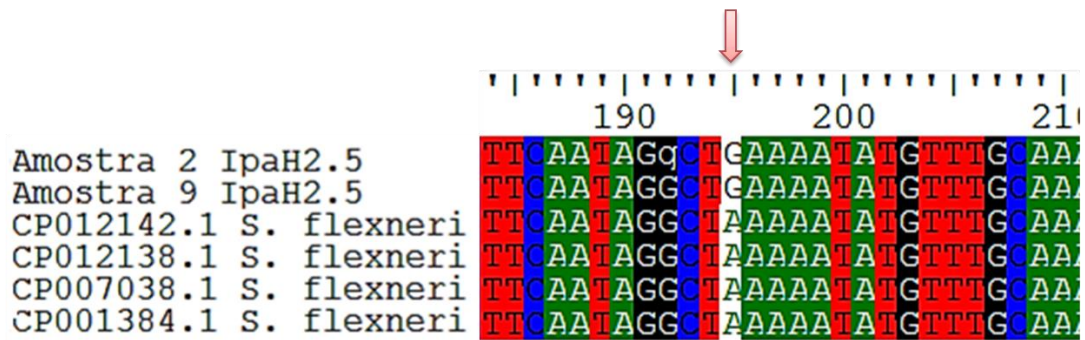
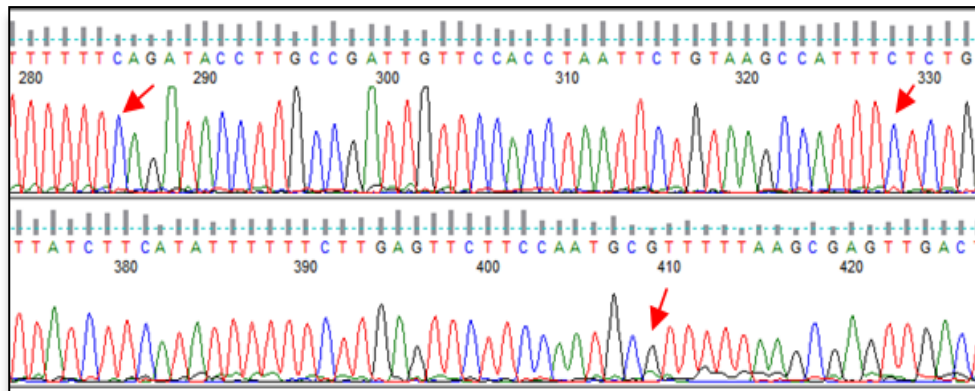


Figura 28: Alinhamento das seqüências de nucleotídeo do gene *IpaH2.5*. Amostras 2 e 9 de *Shigella* e das seqüências de referência do NCBI. A seta indica aonde ocorreu à variação do nucleotídeo das amostras.

O *IpaD* foi o gene mais caracterizado no estudo, pois obtivemos a seqüência completa de sua ORF, além de serem identificadas mutações em 4/10 amostras sequenciadas. As amostras 11, 14, 26 apresentaram 3 substituições de bases (p.591 C > A; p.672 G > T; p.715 G > A). No eletroferograma foi possível verificar um pico bem definido e sem sobreposição, o que indica uma substituição de base (Fig. 29-A). A amostra 17 apresentou apenas uma substituição de base (p.591 C > A) das citadas anteriormente. Destas substituições 2 são de transversões (C>A; G>T) e 1 é de transição (G>A). A análise das mutações fora adicionalmente investigada na estrutura proteica do *IpaD*. Nenhuma dessas variantes de nucleotídeos foram identificadas nas outras 6 seqüências do gene *IpaD*, e foram 100% idênticas com a seqüência referência do GenBank (número de acesso CP012142.1), sendo a primeira seqüência do alinhamento.

A figura 29-B representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor dos nucleotídeos do gene *IpaD* das amostras de *Shigella*, e mostra a região em que foi identificado as alterações.

A)



B)

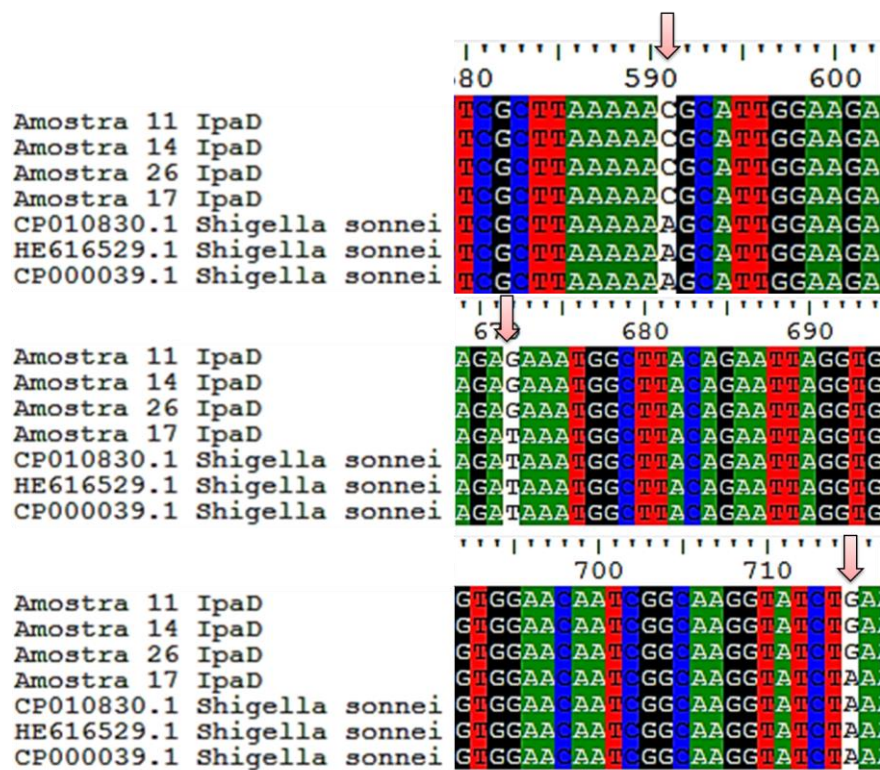


Figura 29: Análise da sequência do gene *IpaD*. A) Eletroferograma do gene *IpaD*, as setas indicam o polimorfismo identificado. B) Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *IpaD* das amostras de *Shigella* contra as sequências do NCBI. As setas indicam aonde ocorreram às variações nucleotídicas nas amostras de *Shigella*.

As substituições do gene *IpaD* resultaram em três mutações *missense* na proteína do IpaD. As três mutações resultaram nas alterações dos aminoácidos nas respectivas posições e resíduos 197 (Lisina -> Asparagina), 224 (ácido aspártico -> Glutamato) e 239 (Lisina -> Glutamato). Na figura 30 A e B podemos observar as posições das mutações na estrutura da proteína IpaD, também submetos a sequência de aminoácidos no programa de modelagem Swiss-Model (BIASINI et al., 2014), que faz a predição de estruturas protéicas através da busca de similaridade com sequências de aminoácidos depositadas nos bancos de dados do BLASTP (NCBI) e PDB (Banco de Dados de Proteínas). Na figura 30-C, podemos observar o provável modelo da proteína IpaD das amostras clínicas de *Shigella*, a identidade entre as sequências foi de 96.42 %.

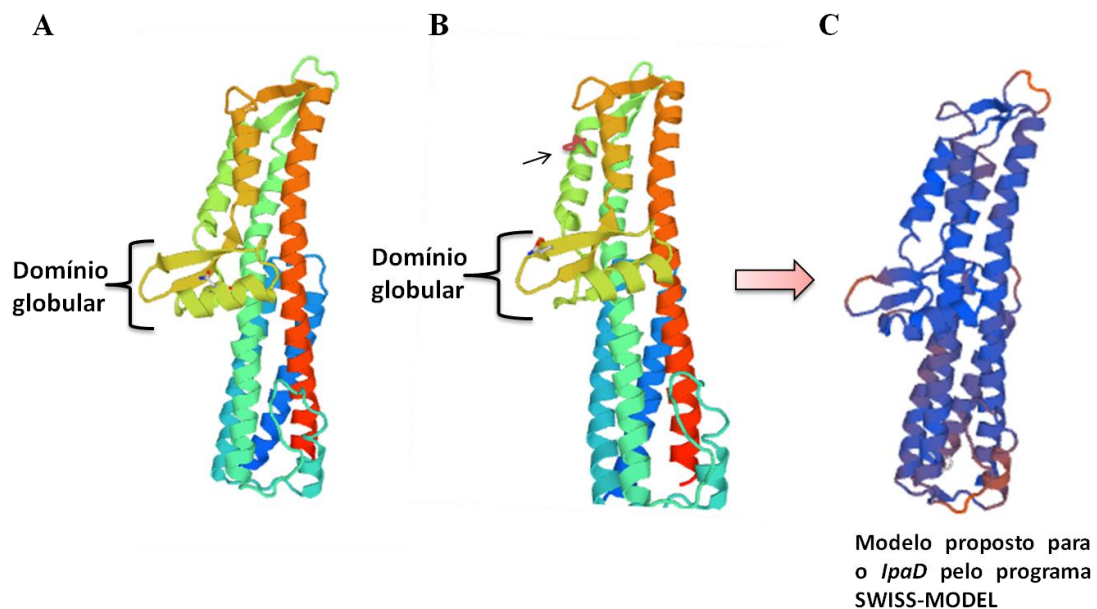


Figura 30: Identificação das mutações na estrutura do IpaD. Em A) o domínio globular mostra a mutação na posição 224 (Asn – Glu); B) No domínio globular a mutação na posição 239 (Lys – Glu), seta preta indica a mutação na posição 197 (Lys – Asn); C) Modelo proposto pelo programa SWISS-MODEL para o IpaD, segundo a similaridade com estruturas depositados no PDB e com sequências de aminoácidos do NCBI.

Na tabela 10 podemos observar o resumo das mutações encontradas no estudo e suas respectivas características. Já na tabela 11 podemos observar as mutações nas amostras clínicas. A amostra 17 apresentou 3 mutações, seguida das amostras 14, 11, 09, 02 que apresentaram 2 mutações e por fim as amostras 15, 16, 26, e 27 que apresentaram apenas 1 mutação.

Tabela 10: Características das mutações encontradas no estudo

Gene	Amostras Clínicas	Mudanças de nucleotídeo	Mudança de aminoácido	Mutações
<i>IpaD</i>	11, 14, 26 17*	p.591C>A	Lys → Asn	Não sinônima/-
		p.672G>T	Asp → Glu	Não sinônima/+
		p.715G>A	Lys → Glu	Não sinônima/+
<i>SenA</i>	17	p.83C>T	Tre → Ile	Não sinônima/-
	2, 9, 15, 27	p.79A>G	Lys → Glu	Não sinônima/+
<i>IpaH3</i>	14, 16	p.309G>A	Gln	Silenciosa
	17	p.366C>A	Asn → Lys	Não sinônima/-
<i>IpaH2.5</i>	2, 9	p.195G>A	Leu	Silenciosa
<i>IpaH6</i>	11	p.481A >G	Lys	Silenciosa

*Amostra 17 apresenta apenas uma substituição.

Tabela 11: Identificação das mutações nas sequências dos genes de virulência em suas respectivas cepas clínicas.

CEPAS	GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>Shigella</i>											
	<i>IpaB</i>	<i>IpaD</i>	<i>IpaH1</i>	<i>IpaH3</i>	<i>IpaH4</i>	<i>IpaH6</i>	<i>IpaH2.5</i>	<i>IpaH7</i>	<i>IpaH7.8</i>	<i>Set1B</i>	<i>SenA</i>	<i>SenB</i>
2				■			■					
5	■								■			
6	■				■	■	■		■	■		
7												
9				■			■					
11		■				■	■					
14		■		■			■					
15				■								
16				■			■					
17		■		■			■				■	
26		■										
27				■		■						
27dzl	■								■			
36	■						■					

Legenda: □: Sequências analisadas sem variantes de nucleotídeos; ■: Sequências analisadas com polimorfismo; ▒: Amostras que não foram sequenciadas.

Nosso estudo se baseou em um estudo preliminar realizado por nosso grupo com cepas clínicas de *Shigella*, onde foi constatada uma variação na presença dos genes de virulência. Também foi observado uma relação entre a presença da enterotoxina Shet1 com o sintoma de diarreia, e o gene *IpaH* com a febre e presença de sangue nas fezes.

Com isso, propomos a realização da tipagem molecular de um número maior de genes de virulência para verificar o perfil regional genético das cepas clínicas de *Shigella*. Assim, como realizar a genotipagem dos genes para identificar as variantes genéticas que podem estar relacionadas com diferentes fenótipos originando uma sintomatologia diversificada entre os pacientes. Notamos que a amostra 17, que apresentou mais mutações, expressou quase todos os sintomas clínicos verificados, sendo que as amostras 14, 11, e 02 que também apresentaram mutações, observou-se uma sintomatologia clínica variada. Concluimos que mutações potuais podem estar relacionadas à variação fenotípica de amostras clínicas de *Shigella*, no entanto estudos adicionais deveram ser realizados, como um novo sequenciamento para confirmar as mutações encontradas no estudo, assim como ensaios *in vivo* e *in vitro*, a fim de verificar se essas mutações interferem na patogenicidade de *Shigella*, aumentando ou diminuindo sua patogênese. Na tabela 12 podemos observar que todos os isolados causaram diarreia em 100% dos pacientes, seguido do sintoma febre, muco, desidratação, sangue oculto nas vezes, sangue visível e vômito.

Tabela 12: Sintomatologia clínica relacionada às amostras de *Shigella* spp.

CEPAS	SINTOMATOLOGIA					
	DIARREIA	FEBRE	VÔMITO	DESIDRATAÇÃO	MUCO	SANGUE OCULTO NAS FEZES
2	■	■	□	■	□	□
5	■	■	■	■	■	■
6	■	■	□	■	□	□
7	■	■	■	■	■	■
9	□	□	□	□	□	□
11	■	■	□	□	□	□
14	■	■	■	□	□	□
15	■	□	■	■	■	■
16	■	■	□	■	■	■
17	■	■	■	□	■	■
26	■	■	□	■	■	■
27	■	■	□	■	□	□
27dzl	□	□	□	□	□	□
36	■	■	□	■	■	■

6 DISCUSSÃO

A tipagem molecular baseada na amplificação de sequências nucleotídicas de bactérias patogênicas é uma importante ferramenta para identificação e caracterização de estirpes bacterianas e contribuem significativamente para estudos clínicos e epidemiológicos. Nossa hipótese é de que os isolados clínicos de *Shigella* possuem um conjunto de genes relacionados à virulência, e que estes podem apresentar variações gênicas que podem influenciar na expressão de diferentes fenótipos de virulência.

O principal objetivo do estudo foi pesquisar a presença de polimorfismo em alguns genes de virulência de *Shigella* a partir da amplificação por PCR e sequenciamento.

6.1 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Shigella* spp.

A patogenicidade de *Shigella* se deve a presença de genes de virulência codificados em todo o genoma. O plasmídeo de virulência é a chave da infecção nas células epiteliais, uma vez que, alberga os genes responsáveis pela invasão nas células epiteliais, escape do vacúolo e a morte dos macrófagos.

Os genes de virulência selecionados para o estudo são frequentemente identificados em estudos epidemiológicos com isolados de *Shigella* (CRUZ et al., 2014; MOKHTARI et al., 2012; QU et al., 2014; SHARMA; SINGH; BAJPAI, 2010). Farshad e colaboradores (2006), mostraram que a identificação dos genes *IpaBCD* e *IpaH* em amostras clínicas por PCR foi eficiente, visto que todos os 82 isolados foram positivos para ambos os genes.

Dos genes que foram pesquisados temos, as invasinas *Ipas*, codificadas no plasmídeo de virulência, são imprescindíveis para a invasão de *Shigella* nas células epiteliais (YANG, et al, 2015; SANSONETTI, 2001). Os genes *IpaH* que modulam a resposta imunológica do hospedeiro e favorecem a sobrevivência e infecção bacteriana, cujo efetores são codificados por genes plasmidiais e cromossomais. Embora esses efetores sejam muitos semelhantes, estudos revelam que a região N-terminal rica em leucina (LRR) é diferente entre os efetores e é responsável pelo direcionamento e reconhecimento do substrato alvo (ASHIDA; SASAKAWA, 2016).

O operon *Ipa* codifica os genes *IpaA*, *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*, no entanto estudos que identificam esses genes individualmente em cepas clínicas de *Shigella* são raros, visto que, a maioria dos estudos de genotipagem molecular utilizam iniciadores universais, fato que

ocorre com os genes *Ipas*, que são identificados com o par do iniciador *IpaBCD* (FARUQUE et al., 2002) que amplifica uma região conservada entre os quatro genes. Semelhantemente ocorre com os genes *IpaH*, que apresentam 12 cópias em todo o genoma de *Shigella*, fato que torna o estudo limitado, uma vez que se precisa caracterizar o genótipo de virulência de um isolado patogênico.

Nosso estudo se diferencia dos demais, pois a tipagem molecular dos genes de virulência foi realizada com iniciadores específicos, ou seja, que amplificam cada invasina *Ipa* individualmente, já que cada gene codifica para uma proteína diferente em tamanho, estrutura e função. Os genes *IpaC*, *IpaD* e *IpaA* foram identificados em todas as amostras, seguido do gene *IpaB* com 71,4%. Quatro amostras não apresentaram o gene *IpaB*; a falta de uma dessas invasinas sem dúvida é um prejuízo grande para *Shigella*. O gene *IpaB* por sua vez é crítico para a patogênese de *Shigella*, devido a múltiplas funções exercidas por esse efector, dentre elas, causar a morte do macrófago, facilitar o escape do vacúolo, promover a fragmentação e o desaparecimento do complexo de golgi, além de regular a secreção de efetores na ponta da agulha do sistema de secreção T3SS (MOUNIER et al., 2012; SHEN et al., 2010; YANG et al., 2015). Estudos confirmaram que a ausência do gene *IpaB*, viabiliza a fagocitose e destruição de *Shigella* por células do sistema imune inato, já a sua presença em macrófagos e células dendríticas infectadas ocasiona uma rápida morte celular favorecendo a disseminação de *Shigella* (EDGEWORTH et al. 2002; NONAKA, 2003).

Para amplificação da família multigênica *IpaH*, foi desenhado cerca de 12 pares de iniciadores, porém foram utilizados apenas 11. Cerca de 7 cópias do gene *IpaH* tiveram amplificação em 100% das cepas estudadas, e 5 cópias tiveram ampliações variadas, sendo que, o *IpaH6* e *IpaH9.8* foram amplificados em 85,7% das amostras, seguido do *IpaH7.8* que teve amplificação positiva em 78,5% das cepas, em comparação com o gene *IpaH2.5* que teve uma amplificação de apenas 51,8%. Foram utilizadas 14 amostras clínicas de *Shigella* para amplificação de 11 cópias dos genes *IpaH*, se positivos totalizariam cerca de 154 amplicons, porém no estudo foram obtidos cerca de 141 amplicons que caracteriza 91,5% de amplificação positiva.

Estudos demonstram que a detecção do gene *IpaH* pode servir como marcador molecular para indicar a presença de *Shigella* em águas ambientais. Na caracterização genotípica de genes de virulência de 40 isolados de *Shigella* spp. por PCR, foi observado a presença do gene *IpaH* em todas as amostras, seguido do gene *IpaBCD* presente em 23 isolados (SHARMA; SINGH; BAJPAI, 2010). Em outro estudo realizado por NA-UBOL e colaboradores (2006) pesquisando a presença do gene *IpaH* em 183 amostras de pacientes

com shigelose, o gene teve uma amplificação positiva para todos os isolados. Devido a esses fatos, o gene *IpaH* é um alvo atraente para ferramentas de diagnóstico, visto que, a perda do plasmídeo de virulência, não inviabiliza sua amplificação, uma vez que também está presente no cromossomo. No entanto, a identificação de uma cópia do gene *IpaH* não é um indicador absoluto de virulência (MOKHTARI et al., 2012).

Por fim temos as enteroxinas Shet1 e Shet2 que foram descritas por alterarem o transporte de água e eletrólitos no intestino e são constantemente relacionadas com a presença da diarreia aquosa em pacientes com shigelose (FAHERTY et al., 2012; NIYOGI; VARGAS; VILA, 2004). Shet1 é codificada por dois genes cromossomais (*SetIA* e *SetIB*), já a enterotoxina Shet2 é codificada pelo gene *Sen* presente no plasmídeo.

A amplificação dos genes *SenA* e *SenB* foi de 100%, sendo que apenas uma amostra não apresentou os genes *SetIA* e *SetIB* o que significa uma amplificação de 92,8%. Resultados parecidos foram encontrados por Zhang e colaboradores (2014), onde 99% dos isolados apresentavam o gene *Sen*, no entanto, o mesmo não ocorreu com os genes *SetIA* e *SetIB* que tiveram uma amplificação de 29,3 e 32,8%, respectivamente.

Em nosso estudo foi possível caracterizar o perfil de virulência de 14 amostras clínicas de *Shigella*, que foram pesquisadas quanto à presença de genes de virulência utilizando iniciadores específicos desenvolvidos no estudo. No resultado da tipagem molecular, podemos destacar 10 cepas (2, 7, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 26, 27) que apresentaram 19 ou 18 genes de virulência. No que diz respeito à presença dos genes de virulência, podemos sugerir que essas amostras albergam em seu genoma uma grande variedade de genes moduladores da resposta imunológica, assim como os genes responsáveis pelo seu fenótipo invasivo.

No entanto a amostra 6 foi a que menos apresentou os genes de virulência, visto que teve uma amplificação positiva para 11 dos 19 genes investigados, e os motivos dessa diferença não estão muito bem esclarecidos.

6.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Nessa etapa visamos identificar variantes de nucleotídeos relacionados a genes de virulência de *Shigella*. Apesar dos resultados da amplificação dos genes de virulência serem obtidos com sucesso, no sequenciamento alguns genes apresentaram sequências de baixa qualidade e outros não formaram contigs. O objetivo inicial do grupo era analisar a ORF completa do gene, porém por motivos técnicos não obtivemos os fragmentos de tamanho esperado, no entanto, foi feita a análise parcial das sequências gênicas.

Dos 19 genes que foram sequenciados para identificação da variabilidade genética, apenas 12 puderam ser analisados. Apenas dois genes *Set1B* e *IpaD* tiveram sequências contíguas no sequenciamento, enquanto que os genes *IpaB*, *IpaH2.5*, *IpaH7.8*, *IpaH3*, *IpaH4*, *IpaH6*, *IpaH7*, *SenA* e *SenB* tiveram apenas sequências únicas.

A sequência de cada gene foi analisada comparativamente com as sequências de *Shigella* spp. disponíveis no GenBank. As sequências dos genes *IpaB*, *IpaH1*, *IpaH7* e *Set1A* apresentaram 100% de identidade com as sequências dos bancos de dados do NCBI, os genes *IpaH2.5*, *IpaH7.8*, *IpaH3*, *IpaH4*, *IpaH6*, *IpaD*, *SenA* e *SenB* tiveram 99% de identidade, sendo que apenas 5 deles apresentaram *mismatch* que foram caracterizados como mutações. Pelo fato dessas mutações serem identificadas em uma região codificante, foi verificado o efeito dessa mutação na sequência de aminoácidos da proteína.

A maioria dos estudos que tentam determinar a base genética de bactérias se limita a identificação de clones emergentes que apresentam o fenótipo de interesse (LEES et al., 2016). A variação genética em procariotos é um dos principais mecanismos de evolução biológica. Essas variações geralmente ocorrem espontaneamente por erros durante a replicação do DNA que ocasionam alterações na sequência de nucleotídeos como substituições, inserções e deleções (ARBER et al., 2000; GYLES; BOERLIN, 2014).

Os genes que apresentaram mutações foram o *IpaD*, *SenA*, *IpaH3*, *IpaH2.5* e *IpaH6*. No resultado do sequenciamento do gene *SenA*, apenas a amostra 17 apresentou uma substituição de base na posição 83 do nucleotídeo, e foi identificada como substituição de transição de C > T, que resultou numa mutação *missense*, ou seja, a alteração de um único nucleotídeo provocou a formação de um códon que codifica um aminoácido diferente do original. Essa substituição resultou na alteração do aminoácido treonina por uma isoleucina.

O mecanismo de recombinação contribui para a diversidade genética entre populações bacterianas, porém, eventos como este são concentrados em loci particulares, conhecidos como hotspots, e geralmente estão relacionados a genes que estão em constantes pressões seletivas, como os genes que interferem na resposta imune do hospedeiro e genes de resistência a antibiótico (CHEWAPREECHA et al., 2014). Evento que pode estar relacionado com os genes *IpaHs*, uma vez que, seus efetores trabalham em sincronismo para atenuar a resposta imunológica do hospedeiro.

Dos 7 genes *IpaHs* analisados, 3 apresentaram mutações em sua sequência de nucleotídeo. O gene *IpaH6* que apresentou uma substituição de base na posição 481 de A > G em uma amostra clínica, já no gene *IpaH2.5*, as amostras 2 e 9 apresentaram uma substituição

de base na posição 195 do nucleotídeo de G > A. Ambas as mutações não alteraram o aminoácido na sequência da proteína e são ditas como mutação silenciosa.

O gene *IpaH3* apresentou uma maior variação genotípica entre as amostras clínicas estudadas, sendo que, só foi analisado um trecho de 350 pb na extremidade 5', o que nos leva acreditar que a ORF completa desse gene possui um número significativo de mutações.

No gene *IpaH3* as amostras 2, 9, 7 e 27 apresentaram uma substituição na base na posição 79 de A > G, que conferiu uma mutação *missense* e causou a modificação do aminoácido Lisina pelo ácido glutâmico. As amostras 14 e 16 exibiram uma substituição de base na posição 309 de G > A, e não alterou o aminoácido na sequência da proteína, resultando numa mutação silenciosa. Já a amostra 17 teve uma substituição de base na posição 336 da sequência de C>A que ocasionou uma mutação *missense*, e alterou o aminoácido asparagina para lisina na sequência da proteína.

Algumas mutações podem ser benéficas ou desfavoráveis, se conferir uma vantagem à estirpe selvagem, em certas condições ambientais a mesma supera o crescimento da sua linhagem original e substitui a progênie dando origem a outros mutantes. Este é o caso de mutações que conferem resistência a antibióticos, em que o mutante resistente é selecionado em um ambiente na qual as bactérias são expostas ao antibiótico em questão (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

O gene *IpaD* apresentou três substituições de bases nas seguintes posições e nucleotídeos, posição 591 de C>A, posição 672 de G>T e na posição 715 de G>A. Essas substituições resultaram em três mutações *missense* não sinomimas, duas conservativas ou seja, o aminoácido trocado apresenta função similar ao aminoácido original, e uma não-conservativa, o aminoácido substituído apresenta uma função diferente do original. As três mutações foram identificadas no domínio C-terminal do *IpaD*, e podem diminuir, inativar ou aumentar a função desse efetor. Estudos relatam que mutações de um único aminoácido no complexo da ponta da agulha (formados pelos *IpaD*, *IpaC* e *IpaB*), altera a sua conformação estrutural e resulta numa secreção desregulada através do translocon (KENJALE et al., 2005; VEENENDAAL et al., 2007). Já em outro estudo investigando o papel do *IpaD* na ponta da agulha, foi realizado a seleção de mutantes em meio induzido com vermelho de congo, os mutantes apresentaram substituição de alguns aminoácidos, e uma mutação foi analisada quanto a interferência na atividade do *IpaD*. Todos os mutantes localizados na região C-terminal apresentaram um defeito na regulação da secreção e na transdução de sinal na ponta da agulha do T3SS (ROEHRICH et al., 2013).

Mutações em uma região codificante podem ter um efeito deletério (inativação ou baixa atividade) ou benéfico (atividade melhorada ou nova) (MURRAY et al., 2006).

A ponta da agulha do T3SS é formada por quatro moléculas do IpaD e uma do IpaB, sendo que, o domínio C-terminal dessas proteínas é necessário para montagem e ligação na ponta do T3SS. A região C-terminal do IpaD apresenta um domínio globular que é necessário para a interação IpaD-IpaB. Duas mutações foram identificadas no domínio globular e podem prejudicar a interação entre esses efetores, e conseqüentemente diminuir a invasão de *Shigella* nas células epiteliais, uma vez que, a proteína IpaD é o primeiro translocador que se liga na ponta do T3SS, esse recruta os outros efetores IpaB e IpaC que se inserem na membrana plasmática e formam o poro que libera os outros efetores no citoplasma da célula hospedeira.

Com isso uma ou mais mutações no domínio C-terminal desse efector pode alterar drasticamente a sua atividade e a invasão de *Shigella* nas células epiteliais, uma vez que, a proteína IpaD se localiza na cima da agulha do sistema de secreção T3SS, e serve como um sinalizador para ligação dos efetores IpaB e IpaC na ponta da agulha.

O estudo da identificação de determinantes genéticos específicos é essencial para compreender o mecanismo de patogênese e a propagação de variantes virulentas na população de *Shigella*. Mais estudos são necessários para determinar as variantes genéticas dos genes de virulência, uma vez que, a identificação de uma variação associada a qualquer característica requer que a mesma não esteja unicamente presente em uma única linhagem clonal (LEES et al., 2016). Estudos com uma quantidade amostral maior deverão ser realizados, a fim de confirmar as mutações encontradas neste estudo, assim como um aprofundamento mais específico do efeito dessas mutações no fenótipo de virulência das amostras clínicas.

A variação da presença e/ou ausência dos genes de virulência em isolados clínicos de *Shigella*, foram primariamente observados em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa. Onde a característica de existência ou não destes genes foram relacionados aos sinais e sintomas clássicos da shigelose (CRUZ et al., 2014). As variantes de nucleotídeos encontradas nos genes de virulência podem estar relacionadas à sintomatologia clínica variada encontrada no estudo anterior. Essas alterações podem interferir de alguma forma na expressão dos genes de virulência e nosso estudo é um indicio de que mutações pontuais podem influenciar no fenótipo dos isolados e resultar em manifestações clínicas variadas.

CONCLUSÃO

- Os iniciadores desenvolvidos no estudo foram específicos para os genes alvos e amplificaram com êxito os genes de virulências nas cepas clínicas *Shigella* sp;
- A amplificação dos genes do sistema de secreção Ipa nas cepas clínicas foi realizada com sucesso. Os genes *IpaA* e *IpaC* e *IpaD* amplificaram em 100% das amostras, seguido do *IpaB* que teve uma amplificação positiva em 71,4% das amostras;
- A amplificação dos genes moduladores da resposta imunológicas *IpaHs* foi positiva em todas as amostras. Das 11 cópias do *IpaH* estudadas no estudo, 7 (*IpaH1*, *IpaH3*, *IpaH4*, *IpaH5*, *IpaH7*, *IpaH1.4* e *IpaH4.5*) tiveram 100% de amplificação, seguido do *IpaH6* e *IpaH9.8* com 85,7%, *IpaH7.8* com 78,5% de amplificação e *IpaH2.5* que amplificou em apenas 51,8% das amostras clínicas;
- A amplificação dos genes com codificam para as enterotoxinas *She1A* e *Shet1B* foi obtido com sucesso. Todas as amostras apresentaram 100% de amplificação para os genes *SenA* e *SenB*, seguido do gene *Set1A* e *Set1B* com 92,8% de amplificação positiva;
- Dos 12 genes analisados para busca de variantes de nucleotídeos, 5 apresentaram mutações de ponto. O gene *IpaH3* apresentou substituições de nucleotídeo em 7 amostras, seguido do *IpaD* que apresentou polimorfismo em 4 amostras clínicas que resultaram em 3 mutações *missense* na sequência de aminoácidos da proteína;
- Esses resultados representam uma inovação no âmbito da identificação da variabilidade genética de *Shigella*, e de como o comportamento da expressão positiva e/ou negativa destes genes podem influenciar diretamente nas manifestações clínicas da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAISSÉ, H. Molecular and Cellular Mechanisms of *Shigella flexneri* Dissemination. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. March, p. 1–10, 11 mar. 2016.
- ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n. April, p. 45, 2016.
- ÂNGELA BERNARDES SOUSA, M. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30–35, fev. 2013.
- ANGELINI, M. et al. Molecular epidemiology of *Shigella* spp. strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 685–692, 2009.
- APPANNANAVAR, S. B. et al. Shigellemia in a post renal transplant patient: a case report and literature review. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 2–4, 13 fev. 2014.
- ARBER, W. et al. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–7, jan. 2000.
- ASHIDA, H. et al. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. **Nature cell biology**, v. 12, n. 1, p. 66–73–9, jan. 2010.
- ASHIDA, H.; KIM, M.; SASAKAWA, C. Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1757–66, dez. 2014.
- ASHIDA, H.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* Manipulates Host Immune Responses by Delivering Effector Proteins with Specific Roles. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. May, p. 1–12, 7 maio 2015.
- ASHIDA, H.; NAKANO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH0722 E3 Ubiquitin Ligase Effector Targets TRAF2 to Inhibit PKC–NF-κB Activity in Invaded Epithelial Cells. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003409, 6 jun. 2013.
- ASHIDA, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH Family Effectors as a Versatile Model for Studying Pathogenic Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. January, p. 100, 6 jan. 2016.
- BAKER, K. S. et al. The extant World War 1 dysentery bacillus NCTC1: a genomic analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9955, p. 1691–1697, nov. 2014.
- BARISON, N.; GUPTA, R.; KOLBE, M. A sophisticated multi-step secretion mechanism: How the type 3 secretion system is regulated. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 1809–1817, 2013.

- BARTA, M. L. et al. Identification of the bile salt binding site on IpaD from *Shigella flexneri* and the influence of ligand binding on IpaD structure. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 3, p. 935–945, 2012.
- BASTOS, F. C.; LOUREIRO, E. C. B. Antimicrobial Resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 607–610, 2011.
- BASTOS, F. C.; LOUREIRO, E. C. B.; HOFER, E. FREQUENCY OF *Shigella flexneri* SEROTYPES ISOLATED IN THE STATE OF PARÁ, BRAZIL (1979-2009). **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277–284, 22 out. 2012.
- BEYENE, G.; TASEW, H. Prevalence of intestinal parasite, *Shigella* and *Salmonella* species among diarrheal children in Jimma health center, Jimma southwest Ethiopia: a cross sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 10, 2014.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W252–W258, 1 jul. 2014.
- BROTCKE ZUMSTEG, A. et al. IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 435–45, abr. 2014.
- CAMPBELL-VALOIS, F.-X.; PONTIER, S. M. Implications of Spatiotemporal Regulation of *Shigella flexneri* Type Three Secretion Activity on Effector Functions: Think Globally, Act Locally. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 28, 9 mar. 2016.
- CARAYOL, N.; TRAN VAN NHIEU, G. Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–37, fev. 2013.
- CHATTERJEE, S. et al. Structure and Biophysics of Type III Secretion in Bacteria. **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2508–2517, 16 abr. 2013.
- CHENG, Fan et al. Gene expression profiling of the pH response in *Shigella flexneri* 2a. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 1, p. 12–20, 2007.
- CHEWAPREECHA, C. et al. Comprehensive Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Beta-lactam Resistance within Pneumococcal Mosaic Genes. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 8, p. e1004547, ago. 2014.
- CRUZ, C. B. N. DA et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- DARMON, E.; LEACH, D. R. F. Bacterial genome instability. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 78, n. 1, p. 1–39, mar. 2014.
- DEKKER, J. P.; FRANK, K. M. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 225–246, jun. 2015.

DEMALI, K. A.; JUE, A. L.; BURRIDGE, K. IpaA targets beta1 integrins and rho to promote actin cytoskeleton rearrangements necessary for *Shigella* entry. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39534–41, 22 dez. 2006.

DICKENSON, N. E. et al. N-terminus of IpaB provides a potential anchor to the *Shigella* type III secretion system tip complex protein IpaD. **Biochemistry**, v. 52, n. 49, p. 8790–9, 10 dez. 2013.

DINIZ-SANTOS, D. R. et al. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 77–83, 2005.

EPLER, C. R. et al. Liposomes recruit IpaC to the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus needle as a final step in secretion induction. **Infection and immunity**, v. 77, n. 7, p. 2754–61, jul. 2009.

EPLER, C. R. et al. Ultrastructural analysis of IpaD at the tip of the nascent MxiH type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. **Journal of Molecular Biology**, v. 420, n. 1–2, p. 29–39, 2012.

EDGEWORTH, Jonathan D. et al. Cytotoxicity and interleukin- 1 β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte- derived dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 32, n. 5, p. 1464-1471, 2002.

FAHERTY, C. et al. Chromosomal and Plasmid-Encoded Factors of *Shigella flexneri* Induce Secretogenic Activity Ex Vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

FARFÁN, M. J. et al. *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 332–339, 2011.

FARSHAD, S. et al. Characterization of *Shigella* Strains in Iran by Plasmid Profile Analysis and PCR Amplification of *ipa* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2879–2883, 1 ago. 2006.

FARUQUE, S. M. et al. 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 Isolation of *Shigella dysenteriae* Type 1 and *S. flexneri* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3908–3913, ago. 2002.

FASANO, A et al. Effect of *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. **Gut**, v. 40, n. 4, p. 505–511, 1997.

GALL, T. L. Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 951–962, 1 mar. 2005.

GAL-MOR, Ohad; FINLAY, B. Brett. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1707-1719, 2006.

- GYLES, C.; BOERLIN, P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 328–40, 1 mar. 2014.
- HICKS, S. W.; GALÁN, J. E. Hijacking the host ubiquitin pathway: structural strategies of bacterial E3 ubiquitin ligases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 41–46, 2010.
- IZARD, T.; TRAN VAN NHIEU, G.; BOIS, P. R. J. *Shigella* applies molecular mimicry to subvert vinculin and invade host cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 3, p. 465–475, 6 nov. 2006.
- JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: Pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 43–58, 2004.
- JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. The acid-resistance pathways of *Shigella flexneri* 2457T. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2593–2602, 2007.
- KANE, K. A.; DORMAN, C. J. VirB-mediated positive feedback control of the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 19, p. 5264–5273, 2012.
- KENJALE, R. et al. The Needle Component of the Type III Secretion of *Shigella* Regulates the Activity of the Secretion Apparatus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 52, p. 42929–42937, 30 dez. 2005.
- KILLACKEY, S. A.; SORBARA, M. T.; GIRARDIN, S. E. Cellular Aspects of *Shigella* Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 38, 2016a.
- KILLACKEY, S. A.; SORBARA, M. T.; GIRARDIN, S. E. Cellular Aspects of *Shigella* Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 38, jan. 2016b.
- KIM, M. et al. Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition. **Cells**, v. 3, n. 3, p. 848–64, 18 ago. 2014.
- KNIREL, Y. A. et al. O-Antigen Modifications Providing Antigenic Diversity of *Shigella flexneri* and Underlying Genetic Mechanisms. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 80, n. 7, p. 901–14, 2015.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, 2013.
- LEE, C. A. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. **Infectious agents and disease**, v. 5, n. 1, p. 1–7, out. 1996.
- LEE, J.; PARK, H.; PARK, Y. Molecular Mechanisms of Host Cytoskeletal Rearrangements by *Shigella* Invasins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18253–18266, 10 out. 2014.

LEES, J. A. et al. Sequence element enrichment analysis to determine the genetic basis of bacterial phenotypes. **bioRxiv**, p. 038463, 2016.

LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; LIMA, A. A. M. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30–37, 2015.

LIVIO, S. et al. *Shigella* Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, 2014.

MAO, Y. et al. Changing trends and serotype distribution of *Shigella* species in Beijing from 1994 to 2010. **Gut pathogens**, v. 5, p. 21, 2013.

MARTEYN, B.; GAZI, A.; SANSONETTI, P. *Shigella*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 104–120, mar. 2012.

MEDEIROS, M. I. C. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 21–24, fev. 2001.

MOKHTARI, W. et al. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 209–222, jul. 2012.

MOTA, A. J.; BACK-BRITO, G. N.; NOBREGA, F. G. A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction. In: **MYCOSES**. COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, 2009. p. 94-94.

MOUNIER, J. et al. *Shigella* effector IpaB-induced cholesterol relocation disrupts the Golgi complex and recycling network to inhibit host cell secretion. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 3, p. 381–9, 13 set. 2012.

NATARO, J. P. et al. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infection and immunity**, v. 63, n. 12, p. 4721–8, dez. 1995.

NA-UBOL, M. et al. Molecular characteristics of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 5, p. 997, 26 out. 2006.

NICOLAS, X.; GRANIER, H.; LE GUEN, P. Shigellose ou dysenterie bacillaire. **Presse Medicale**, v. 36, n. 11 II, p. 1606–1618, 2007.

NIE, H. et al. Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. **BMC genomics**, v. 7, p. 173, 2006.

NIYOGI, S. K.; VARGAS, M.; VILA, J. Prevalence of the *sat*, *set* and *sen* genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 6, p. 574–576, jun. 2004.

- NONAKA, T. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2513–2527, 1 set. 2003.
- NUNES, M. R. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125-128, 2012.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2006.
- OJHA, S. C. et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **BioMed research international**, v. 2013, p. 412370, jan. 2013.
- OKUDA, J. et al. *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF35 to modulate host immune responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 2, p. 531–539, 2005.
- ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507–517, 2006.
- PARK, H. et al. Novel vinculin binding site of the IpaA invasin of *Shigella*. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 26, p. 23214–21, 1 jul. 2011.
- PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 1, p. 11–18, 2005.
- PARSOT, C. *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 110–116, 2009.
- PEREPELOV, A. V. et al. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: Final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 201–210, 2012.
- PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*'s ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 119–129, 2007.
- PICKING, W. L.; PICKING, W. D. The Many Faces of IpaB. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 12, jan. 2016.
- PROSSEDA, G. et al. Shedding of genes that interfere with the pathogenic lifestyle: The *Shigella* model. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 6–7, p. 399–406, 2012.
- QU, M. et al. An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 904–908, 14 jul. 2014.
- RANALLO, R. T. et al. Virulence, inflammatory potential, and adaptive immunity induced by *Shigella flexneri* msbB mutants. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 400–412, 2010.

ROEHRICH, A. D. et al. The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1682–1691, 2010.

ROEHRICH, A. D. et al. *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. **Molecular microbiology**, v. 87, n. 3, p. 690–706, fev. 2013.

SAHL, J. W. et al. Defining the phylogenomics of *Shigella* species: a pathway to diagnostics. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 3, p. 951–60, 2015.

SANGEETHA, A. V et al. Clinical and microbiological profiles of shigellosis in children. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 32, n. 4, p. 580–6, 2014.

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

SANSONETTI, P. J. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 3, p. G319–G323, 2001.

SCHIAVOLIN, L. et al. Functional insights into the *Shigella* type III needle tip IpaD in secretion control and cell contact. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 268–282, 2013.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134–156, 2008.

SHARMA, A.; SINGH, S. K.; BAJPAI, D. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. with reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. **Microbiological Research**, v. 165, n. 1, p. 33–42, 2010.

SHEN, D. K. et al. Domains of the *Shigella flexneri* type III secretion system IpaB protein involved in secretion regulation. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4999–5010, 2010.

SILVA, T. et al. 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**, v. 103, n. 7, p. 731–733, nov. 2008.

SOUSA, M. Â. B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30–35, fev. 2013.

SUZUKI, S. et al. *Shigella* IpaH7. 8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. E4254–E4263, 2014.

TANEJA, N. et al. Cephalosporin-resistant *Shigella flexneri* over 9 years (2001–09) in India.

The Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 67, n. 6, p. 1347–53, 1 jun. 2012.

TANNER, K.; BRZOVIC, P.; ROHDE, J. R. The bacterial pathogen-ubiquitin interface: lessons learned from *Shigella*. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 1, p. 35–44, jan. 2015.

THONG, Kwai Lin et al. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. **BMC infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

THE, H. C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235–50, 29 abr. 2016.

UD-DIN, A. I. M. S. et al. Changing trends in the prevalence of *Shigella* species: Emergence of multi-drug resistant *Shigella sonnei* biotype g in Bangladesh. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–7, 2013.

UD-DIN, A.; WAHID, S. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1131–1138, dez. 2014.

VEENENDAAL, A. K. J. et al. The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 6, p. 1719–30, 22 mar. 2007.

VENKATESAN, M. M. et al. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3271–3285, 2001.

VIEIRA, M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

WANG, F. et al. *Shigella flexneri* T3SS effector IpaH4.5 modulates the host inflammatory response via interaction with NF- κ B p65 protein. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 474–485, 2013.

YANG, S. C. et al. The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella* spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. **Microbiological Research**, v. 181, p. 43–51, 2015.

ZAIDI, M. B.; ESTRADA-GARCÍA, T. *Shigella*: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. **Current tropical medicine reports**, v. 1, n. 2, p. 81–87, 2014.

ZHANG, C.-L. et al. Epidemic and virulence characteristic of *Shigella* spp. with extended-spectrum cephalosporin resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 260, jan. 2014.

ZHOU, Y.; ZHU, Y. Diversity of bacterial manipulation of the host ubiquitin pathways. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 1, p. 26–34, jan. 2015.

ZYCHLINSKY, A.; SANSONETTI, P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 3, p. 493, 1997.

ANEXO 1

PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DE <i>SHIGELLA</i> spp.										
GENE	FW -10mM	Rv-10mM	MgCl2 -50mM	MgCl2-25mM	DNTP- 10mM	Tampão 10x	Taq 5U	DNA	Ta	Tamanho
<i>Shet1A</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	643pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>Shet1B</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	357pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>Shet2-1</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1838pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>Shet2-2</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5µL	0,125 µL	5µL	59 e 60	1878pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaA</i>	0,5µL	0,5µL	1 µL -2mM	2µL -2mM	0,5 µL	2,5µL	0,125 µL	2 µL	60	2133pb
<i>IpaB</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1883pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaC</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1272pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaD</i>	0,5µL	0,5µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1149pb
<i>IpaH1</i>	0,5µL	0,5µL	1 µL -2mM	2µL -2mM	0,5 µL	2,5µL	0,125 µL	2 µL	59	2049pb
<i>IpaH3</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1925pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaH4</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1902pb
	0,25µL	0,5µL								

GENE	FW -10mM	Rv-10mM	MgCl2 -50mM	MgCl2-25mM	DNTP- 10mM	Tampão 10x	Taq 5U	DNA	Ta	Tamanho
<i>IpaH5</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1902pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaH6</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1986pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaH7</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	2065pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaH1.4</i>	0,5µL	0,5µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1880pb
<i>IpaH2.5</i>	0,5µL	0,5µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1929pb
	0,5µL	0,25µL								
<i>IpaH4.5</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	59	1955pb
	0,25µL	0,5µL								
<i>IpaH7.8</i>	0,5µL	0,5µL	1 µL -2mM	2µL -2mM	0,5 µL	2,5µL	0,125 µL	2 µL	55	1878pb
<i>IpaH9.8</i>	0,5µL	0,25µL	0,75 µL -1,5mM	1,5 µL-1,5mM	0,5 µL	2,5 µL	0,125 µL	2 µL	58	1890pb

ANEXO 2 – Sequências dos genes que foram analisados e resultado do BLASTN

Legenda: **ATG** – Start codon; **TCA**, **TGA**, **TTA** – Stop Codon; Nucleotídeos em verde claro indicam os nucleotídeos que foram encontrados à substituição de base.

ISOLADO	GENE <i>IPAD</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
07	ATG AATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGTCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGATATAAAAAACAACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGCTTTCACAAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAAATAAATCCGCTCAACTATTAGATATTTCCAGGCACGAATATCCAATTAAT AAAGACGCAAGGAATTATTACATTCAGCTCCGAAAAGAAGCCGAGCTTGATGGAGATCAAATGATATCTCATAGAGAAGCTGGGGTAAAAATGCAAACCTCCATCAA TGATATTAATGAACAGTATCTGAAAGTATATGAACATGCCGTTAGTTCATATACTCAAATGTATCAAGATTTTAGCGCTGTTCTTTCCAGCTTGGCCGGCTGGATCT CTCCCGAGGTAAACGACGGAACTCCGTGAAATACAAAGTCAACTCGCTTAAAAAGGCATTGGAAGAACTCAAGGAAAAATATAAGATAAACCCGCTATATCCAGCA AATAACTGTTAGTACAGAAACAAGCAATAAATGGCTTACAGAATTAGGTGGAACAATCGGCAAGGTATCTCAAAAAACGGGGATATGTTGTGAGTATAAACAT GACCCCAATAGACAATATGTTAAAAAGCTTAGATAAATCTAGGTGGAATGGCGAGGTTGTGCTAGATAATGCAAAATATCAGGCATGGAATGCCGATTTCTGCGG AAGATGAAACAATGAAAAATACTTCAAACCTTAGTTCAAATAACAGTAATGCCAATAGTATTTTGTATAATTTAGTAAAGGTTTTGAGTAGTACAATAAGCTCA TGTACAGATACAGATAAACTTTTTCTCCATTT TGA	100%	100%	CP012142.1
09	TCA GAAATGGAGAAAAAGTTTTATCTGTATCTGTACATGAGCTTATTGTACTACTCAAACCTTTACTAAATATCAAAAATACTATTTGGCATTACTGTATTTTTGAA CTAAAGTTTGAAGATTATTTTTCATTTGTTTCCATCTTCGGCAGAGAATCCGGCATTCCATGCCTGATATTTGCATTATCTAGCACAACTCGCCATTTCCACCTAGA TTATCTAAGCTTTTTAACATATGTCTATTGGGGTCATGTTTATACTGACAACATATCCCCCGTTTTTTTGGAGATACCTTGGCGATTGTTCCACCTAATTTCTGTAAG CCATTTATTGCTTGTCTCTGACTAACAGTATTTTGTCTGGATATAGCGGTTTATCTTTATATTTTTCTTGGAGTCTTCCAATGCCTTTTTAAGCGAGTTGACTT GTAATTTACCGAGTTTCCGTCGTTACCTCCGGGAGAGATCCAGCCGGCAAGACTGGAAAGAACAGCGCTAAAATCTTGATACATTTGAGTATATGAACTAACGGCA TGTTCAATACTTTAGATACTGTTTCAATTAATATCATTGATGGAGTTTGCATTTTGGCCACAGTTCTCTATGAGATATCATTTGATCTCCATCAAGCTCGGCTTC TTTCGGAGCTGAATGTAATAAATCTCTTGGCTTTTATTAATTTGATATTCGTCGTTGAAAGAAATATCTAATAGTTGAGCGGATTTATTTACATCCATGCTAATCT GAGATGAATGTAATGCTATTTCTTCTAGCGATGTTTTAGTCAACGTTTTTTGTGAAAGCTCTTTCTTAAATGCCTGATTTGTTGTTCTGATATATGAAGGGTGTGCG TTGAGCATAGTAAGGGAACCTACAGGATGAGAAGTGGTCTGTTTATATCAGAATTAAGTGTTCGGTTGATGAACCGTTGGTATTGTTGGACTGAATGATGA GGTGGAAATACTATTAGTCAGAGTTGTTATATT CAT	100%	100%	CP012142.1
11	TCA GAAATGGAGAAAAAGTTTTATCTGTATCTGTACATGAGCTTATTGTACTACTCAAACCTTTACTAAATATCAAAAATACTATTTGGCATTACTGTATTTTTGAA CTAAAGTTTGAAGATTATTTTTCATTTGTTTCCATCTTCGGCAGAGAATCCGGCATTCCATGCCTGATATTTGCATTATCTAGCACAACTCGCCATTTCCACCTAGA TTATTTAAGCTTTTTAACATATGTCTATTGGGGTCATGTTTATACTGACAACATATCCCCCGTTTTTTT C AGATACCTTGGCGATTGTTCCACCTAATTTCTGTAAG CCATTT C TCTGCTTCTTCTGACTAACAGTATTTAGTTGCTGGATATAGCGGTTTATCTTCAATTTTTCTTGGAGTCTTCCAATGC G TTTTTAAGCGAGTTGACTT GTAATTTACCGAGTTTCCGTCGTTACCTCCGGGAGAGATCCAGCCGGCAAGACTGGAAAGAACAGCGCTAAAATCTTGATACATTTGAGTATATGAACTAACGGCA TGTTCAATACTTTAGATACTGTTTCAATTAATATCATTGATGGAGTTTGCATTTTGGCCACAGTTCTCTATGAGATATCATTTGATCTCCATCAAGCTCGGCTTC TTTCGGGCTGAATGTAATAAATCTCTTGGCTTTTATTAATTTGATATTCGTTCTGGAAAGAATACCAATAGTTGAGCGGATTTATTTACATCCATGCTAATCT GAGATGAATGTAATGCTATTTCTTCTAGCGATGTTTTAGTCAACGTTTTTTGTGAAAGCTCTTTCTTAAATGCCTGATTTGTTGTTCTGATATATGAAGGGTGTGCG TTGAGCATAGTAAGGGAACCTACAGGATGAGAAGTGGTCTGTTTATATCAGAATTAAGTGTTCGGTTGATGAACCGTTGGTATTGTTGGACTGAATGATGA GGTGGAAATACTATTAGTCAGAGTTGTTATATT CAT	99%	100%	CP010830.1
14	ATG AATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGTCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGATATAAAAAACAACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGCTTTCACAAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAAATAAATCCGCTCAACTATTGGATATTTCCAGGAACGAATATCCAATTAAT AAAGACGCAAGGAATTATTACATTCAGCTCCGAAAAGAAGCCGAGCTTGATGGAGATCAAATGATATCTCATAGAGAAGCTGGGGTAAAAATGCAAACCTCCATCAA TGATATTAATGAACAGTATCTGAAAGTATATGAACATGCCGTTAGTTCATATACTCAAATGTATCAAGATTTTAGCGCTGTTCTTTCCAGCTTGGCCGGCTGGATCT CTCCCGAGGTAAACGACGGAACTCCGTGAAATACAAAGTCAACTCGCTTAAAA C GCAATTGGAAGAACTCAAGGAAAAATATAAGATAAACCCGCTATATCCAGCA ACTAATACTGTTAGTACAGAAAGAAGCAG A GAAATGGCTTACAGAATTAGGTGGAACAATCGGCAAGGTATCT G AAAAAACGGGGATATGTTGTCAATATAAACAT GACCCCAATAGACAATATGTTAAAAAGCTTAAATAAATCTAGGTGGAATGGCGAGGTTGTGCTAGATAATGCAAAATATCAGGCATGGAATGCCGATTTCTGCGG AAGATGAAACAATGAAAAATACTTCAAACCTTAGTTCAAATAACAGTAATGCCAATAGTATTTTGTATAATTTAGTAAAGGTTTTGAGTAGTACAATAAGCTCA TGTACAGATACAGATAAACTTTTTCTCCATTT TGA	99%	100%	CP010830.1

<p>16</p>	<p>ATGAAATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGCCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGTATATAAAAAACACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGATCTCTCACAACAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAACAACATCCGCTCAACTATGGATATTTCCAAAGAAAGAAATATCCAATTAAT AAAGACGCAAGAGAATTATTACATTCAGCCCCGAAAGAAGCCGAGCTTGATGGATATGAAATGATATCTCAGAGAACTGTGGGATAAAATTTGCAAAGTCAATCAA TAATATTAATGAACAGTATCTGAAAGTATATGAACATGCCGTTAGTTCATATACTCAAATGTATCAAGATTTTATCGCTGTTCTTTCCAGTCTTGCCGGCTGGATCT CTCCCGAGGTAACGACGGAACCTCCGTGAAATTACAAGTCAAATCGCTTAAAGACGAATCGCAAAGCTCAAGGAAAAATATAAAGATAAACCCGCTATATCCAGCA AATAATACTGTTAGTAAGGAACAAGCAATAAATGGCTTACAGAATTAGGTGGAACAATCGGCAAGGTATCTGAAAAAACGGGGATATGTTGTCAATATAAACAT GACCCCAATAGACAATATGTTAAAAAGCTTAGATAAATCTAGGTGGAATGGCGAGGTTGTGCTAGATAATGCAAAAATATCAGGCATGGAATGCCGGATTCTCTGCCG AAGATGAAACAATGAAAAATAATCTTCAAACCTTAGTTCAAAAATACAGTAATGCCAATAGTATTTTGTATAATTTAGTAAAGGTTTGTAGTAGTACAATAAGCTCA TGTACAGATACAGATAAACTTTTCTCCATTTCTGA</p>	<p>99%</p>	<p>100%</p>	<p>AY206439.1</p>
<p>17</p>	<p>TCTGAAATGGAGAAAAAGTTTATCTGTATCTGTACATGAGCTTATTGTAAGTACTCATAAACTTTACTAAATATCAAAAATACTATTGGCATTACTGTATTTTGA CTAAAGTTTGAAGATTATTTTCATTGTTTCATCTTCGGCAGAGAATCCGGCATTCATGCCTGATATTTTGCATTATCTAGCACAACTCGCCATTTCCACCTAGA TTATTTAAGCTTTTAAACATATGCTTATTGGGGTCAATGTTTATATTGACAACATATCCCCCGTTTTTTTGTAGATACCTTGCCGATTGTTCCACCTAATTTCTGTAAG CCATTTAATCTGCTTTCTGACTAACAGTATAGTTGCTGATAGGCGTTTATCTTCAATTTCTTGAGTTCCTTCCAATGCTTTTAAAGCGAGTTGACTT GTAATTTACGGAGTTTCCGTCGTTACCTCCGGGAGAGATCCAGCCGGCAAGACTGGAAAGAACAGCGCTAAAATCTTGATACATTTGAGTATATGAACTAACGGCA TGTTCAATATACTTTCAGATACGTTTCAATATCATTTGATGGAGTTTGAATTTTACGCCCAGGTTCTCTATGAGATATCATTTGATCTCCATCAGACTCGGCTTC TTTCCGGGCTGAATGTAATAATTTCTCTTGGCTTTTATTAATTTGGATATTCGTTCTCGGAAAGAATATCCAATAGTTGAGCGGATTTATTTACATCCATGCTAATCT GAGATGAATGTAATGCTATTTCTTCTAGCGATGTTTGTAGTCAACGTTTGTGAAAGCTCTTCTTAAATGCTGATTTGTTGTTCTGATATTAAGAGGTTGCTG TTGAGCATAGTAAGGAACTTACAGGATGAGAAGTGTGCTGTTTTTATATCAGAATTAAGTGTTCGGTGTATGAACCGTTGGTATGTTTGGACTGAATGATGA GGTGGAAATACTATTAGTCAGAGTTGTTATATTCTCAT</p>	<p>99%</p>	<p>100%</p>	<p>CP010830.1</p>
<p>26</p>	<p>ATGAAATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGTCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGTATATAAAAAACACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGCTTTCACAACAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAACAACATCCGCTCAACTATGGATATTTCCAGGAACGAATATCCAATTAAT AAAGACGCAAGAGAATTATTACATTCAGCCCCGAAAGAAGCCGAGCTTGATGGAGATCAAATGATATCTCATAGAGAAGTGTGGGCTAAAATTTGCAAACCTCCATCAA TGATATTAATGAACAGTATCTGAAAGTATATGAACATGCCGTTAGTTCATATACTCAAATGTATCAAGATTTTAGCGCTGTTCTTTCCAGTCTTGCCGGCTGGATCT CTCCCGAGGTAACGACGGAACCTCCGTGAAATTACAAGTCAAATCGCTTAAAAAGCATTTGGAAGAAGTCAAGAAAAAATATAAGATAAACCCGCTATATCCAGCA ACTAATACTGTTAGTCAGAAAGAAGCAGAGAAATGGCTTACAGAAATAGTGAAGTAAATCGGAAACATCGGCAAGGTATCTGAAAAAACGGGGATATGTTGTCAATATAAACAT GACCCCAATAGACAATATGTTAAAAAGCTTAAATAATCTAGGTGGAATGGCGAGGTTGTGCTAGATAATGCAAAAATATCAGGCATGGAATGCCGGATTCTCTGCCG AAGATGAAACAATGAAAAATAATCTTCAAACCTTAGTTCAAAAATACAGTAATGCCAATAGTATTTTGTATAATTTAGTAAAGGTTTGTAGTAGTACAATAAGCTCA TGTACAGATACAGATAAACTTTTCTCCATTTCTGA</p>	<p>99%</p>	<p>100%</p>	<p>CP010830.1</p>
<p>27</p>	<p>ATGAAATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGTCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGTATATAAAAAACACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGCTTTCACAACAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAACAACATCCGCTCAACTATTAGATATTTCCAGGCACGAATATCCAATTAAT AAAGACGCAAGAGAATTATTACATTCAGCTCCGAAAGAAGCCGAGCTTGATGGAGATCAAATGATATCTCATAGAGAAGTGTGGGCTAAAATTTGCAAACCTCCATCAA TGATATTAATGAACAGTATCTGAAAGTATATGAACATGCCGTTAGTTCATATACTCAAATGTATCAAGATTTTAGCGCTGTTCTTTCCAGTCTTGCCGGCTGGATCT CTCCCGAGGTAACGACGGAACCTCCGTGAAATTACAAGTCAAATCGCTTAAAAAGCATTTGGAAGAAGTCAAGAAAAAATATAAAGATAAACCCGCTATATCCAGCA AATAATACTGTTAGTCAGGAACAAGCAATAAATGGCTTACAGAATTAGGTGGAACAATCGGCAAGGTATCTCAAAAAAACGGGGATATGTTGTCAATATAAACAT GACCCCAATAGACAATATGTTAAAAAGCTTAAATAATCTAGGTGGAATGGCGAGGTTGTGCTAGATAATGCAAAAATATCAGGCATGGAATGCCGGATTCTCTGCCG AAGATGAAACAATGAAAAATAATCTTCAAACCTTAGTTCAAAAATACAGTAATGCCAATAGTATTTTGTATAATTTAGTAAAGGTTTGTAGTAGTACAATAAGCTCA TGTACAGATACAGATAAACTTTTCTCCATTTCTGA</p>	<p>100%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1</p>
<p>02</p>	<p>TCTGAAATGGAGAAAAAGTTTATCTGTATCTGTACATGAGCTTATTGTAAGTACTCATAAACTTTACTAAATATCAAAAATACTATTGGCATTACTGTATTTTGA CTAAAGTTTGAAGATTATTTTCATTGTTTCATCTTCGGCAGAGAATCCGGCATTCATGCCTGATATTTTGCATTATCTAGCACAACTCGCCATTTCCACCTAGA TTATCTAAGCTTTTAAACATATGCTTATTGGGGTCAATGTTTATATTGACAACATATCCCCCGTTTTTTTGTAGATACCTTGCCGATTGTTCCACCTAATTTCTGTAAG CCATTTAATGCTTTGCTGACTAACARTATTAATTTGCTGGATATAGCGGTTATCTTTATATTTTCCCTTGAGTTCCTTCCAATGC ATGAAATATAACAACCTCTGACTAATAGTATTTCCACCTCATCATTCAGTCCAAACAATACCAACGGTTCATCAACCGAAACAGTTAATTCTGTATATAAAAAACACGAC CAGTTCATCCTGTAAGTTCCCTTACTATGCTCAACGACACCCCTTCATAAATATCAGAACAACAATCAGGCATTAAGAAAGAGCTTTCACAACAAAACGTTGACTA AAACATCGCTAGAAGAAATAGCATTACATTCATCTCAGATTAGCATGGATGTAACAACATCCGCTCAACTATTAGATATTTCCAGGCACGAATATCCAATTAAT</p>	<p>99%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1</p>

	AAAGACGCAAGAGAATTATTACATTCAGCTCCGAAAGAAGCCGAGCTTGATGGAGATCAAATGATATCTCATA			
15	<p>TCAGAAAATGGAGAAAAAGTTTATCTGTATCTGTACATGAGCTTATTGTACTACTCAAACCTTTACTAAAATTACAAAAACTATTGGCATTACTGTATTTTTGAACTAAAGTTTGAAGATTATTTTTCATTGTTTCATCTTCGGCAGAGAATCCGGCATTCCATGCCTGATATTTTGCATTATCTAGCACAACTCGCCATTTCCACCTAGATTATCTAAGCTTTTAAACATATGTCTATTGGGGTCATGTTTATACTGACAACATATCCCCCGTTTTTTTGGAGATACCTTGCCGATGTTCCACCTAATTCTGTAAGCCATTTATTTGCTTGTTCCTGACTAACAGTATTATTTGCTGGATATAGCGGTTTATCTTTATATTTTTCCTTGAGTCTTCCAATGCCTTTTTAAGCGAGTTGACTTGTAATTTACGGAGTTTCCGTCGTTACCTCCGGGAGAGATCCAGCCGGCAAGACTGGAAAGAACAGCGCTAAAAATCTTGATACATTTGAGTATATGAACCTAACGGCATGnCATATACTTTAGATACTGTTTCATTAATATCATTTGATGGAGTTTGGCAATTT</p>	99%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>SenA</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAAATATGT_GcAAAAATATGATAAAATAAGACAACGCTCTCTGTTGAGACAATcCAgTCTCtATTGCACTCAAACAATTGCCATATTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATGGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAATGTGCCTGCTATTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAGCAGACACTAGAAATAAGTACATCAAATCACAAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAAACTAAAAATGGGGGGGATTTTGTCTTCCASCTTTATGATCCCAACCAT</p>	99%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAAATATGTTTGCAAAAATATGATAAAATAAGACAACGCTCTCTGTTGAGACAATCCAGTCTCTATTGCACTCAAACAATTGCCATATTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATGGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAATGTGCCTGCTATTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCgAAAAAGCAGAGCACAKAAATAARTACATCAAATCACAAATATGGCATTAGGCTTGAA</p> <p>TCAGCTTTTTTATATTCCTCATAATTTCTAGAAAACTACTTcCATTTTTTTTTGTCCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTTCCA TATAAGTTTTTATTGCCTCAAATTCCTATTTTGAAGGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTAGAATCTTTCCGCTCTTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCATGCTAACAGAAAGTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGGCCAGCAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGGGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTARTCCGGGTATCTGCTGTGTACTTCATCATAATAATAAGCGGTGAGCAAATTTTTTCAGCTTAT</p>	99%	100%	CP012142.1
11	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAAATATGTTTGCAAAAATATGATAAAATAAGACAACGCTCTCTGTTGAGACAATCCAGTCTCTATTGCACTCAAACAATTGCCATATTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATGGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAATGTGCCTGCTATTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAGCAGAGCAC TAGAAATAAGTACATCAAATCACAAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAAACTAAAAATGGGGGGGATTTTGTCTTCCAGCTTT</p> <p>TCAGCTTTTTTATATTCCTCATAATTTCTAGAAAACTACTTCCATTTTTTTTTGTCCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTTCCA TATAAGTTTTTATTGCCTCAAATTCCTATTTTGAAGGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTAGAATCTTTCCGCTCTTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCATGCTAACAGAAAGTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGGCCAGCAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCAGGTATCTGCTGTGTACTTCATCATAATAATAAGCGGTGAGCAAATTTTTTCAGCTTATTGTATTTCGATATTTATTGCTCTCTTCTTGAGAGCCTTCCGATGTTTTGATAGTTTTCTGCTGCTTCCATGATAATAAGGAGTCTTGGGATAAA</p>	100%	100%	CP012142.1 CP001064.1
14	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAAATATGTTTGCAAAAATATGATAAAATAAGACAACGCTCTCTGTTGAGACAATCCAGTCTCTATTGCACTCAAACAATTGCCATATTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATGGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAATGTGCCTGCTATTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAGCAGAGCAC TAGAAATAAGTACATCAAATCACAAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAAACTAAAAATGGGGGGGATTTTGTCTTCCASCTTTATGATCCCAACCAT</p>	100%	100%	CP012142.1 CP001064.1

	<p>AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGATT TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTCCATTTTTTTTTGTCcCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTtCATTTTTTATTATTCCCA TATAAGTTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTTAGAATCTTTCCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCAATCAGCCTGTCCATTATCAATGCTAACAGAAGTCCGGGAA CATTTGTCATATCTCCTTGAGGCCAGCAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCAGGTATCTGCTGTGTACTTCATCATAATAAATAAGCGGTGAGCAAATTTTTTCAGCTTATTGTATTCGATATTTATTGCTCTCTT CTTGAGAAGCCTTCCGTATGTTTTGATAGTTTTcGCATGCCATTTt</p>			
<p>15</p>	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGTTtGcAAAAtatGATAAATAAAGACAACGCTCTGTTGAGACaaTCCAGTCTCTATTGCACTCAAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATAAAAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCCTGCTATTTATTTATTTGTTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAAGCAGAGCACAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGGATTTTTGTCATTACAGCTTTATGATCCCAACCATACAGCAACTCATT TACGAGCAGAGTTTAAACAAATTAACCTTAGC TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTCCaTTTTTTTTGTCcCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTCCCA TATAAGTTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTTAGAATCTTTCCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCAATCAGCCTGTCCATTATCAATGCTAACAGAAGTCCGGGAA CATTTGTCATATCTCCTTGAGGCCAGCAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGGCTaAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCGGGTATCTGCTGTGTACTTCATCATAATAAATAAGCGGTGAGCAAATTTTTTCaGCTTATTGTATTCGATATTT</p>	<p>100%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1</p>
<p>16</p>	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGTTtGcAAAAtatGATAAATAAAGACAACGCTCTGTTGAGACAAaCCAGTCTCTATTGCACTCAAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATAAAAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCCTGCTATTTATTTATTTGTTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCaTCCGAAAAAAGCAGAGCACAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAA TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTCCATTTTTTTTTGTCcCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTCCCA TATAAGTTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTTAGAATCTTTCCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCAATCAGCCTGTCCATTATCAATGCTAACAGAAGTCCGGGAA CATTTGTCATATCTCCTTGAGGCCAGCAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCGGGTATCTGCTGTGTACTTCATCATAATAAATAAGCGGTGAGCAAATTTTTTCAGCTTATTGTATTCGATATTTATTGCTCTCTT CTTGAGAAGCCTTCCGTATGTTTTGATAG</p>	<p>100%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1 CP001064.1</p>
<p>17</p>	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGTTTGGCAAAATATGATAAATAAAGACAACGCTCTGTTGAGACAAaCCAGTCTCTATTGCACTCAAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATAAAAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCCTGCTATTTATTTATTTGTTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAAGCAGAGCACAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGGATTTTTGTCATTACAGCTTTATGATCCCAACCATACAGCAACTCATT TACGAGCAGAGTTTAAACAAATTAACCTTAGCTAAAAATAAAAAACTGACTGTAGATAATTTTCT</p>	<p>99%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1</p>
<p>26</p>	<p>ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGTTTGGCAAAATATGATAAATAAAGACAACGCTCTGTTGAGACAAaCCAGTCTCTATTGCACTCAAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTATTAAATCTAAATTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATAAAAATATGTTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCCTGCTATTTATTTATTTGTTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATATTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTCATCCGAAAAAAGCAGAGCACAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGGATTTTTGTCATTACAGCTTTATGATCCCAACCATACAGCAACTCATT TACGAGCAGAGTTTAAACAAATTAACCTTAGCTAAAAATAAAAAACTGACTGTAGATAATTTTCTTGATGAAAAACATCAG TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTCCATTTTTTTTTGTCcCAAGTGTCTGCTATTTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTCCCA TATAAGTTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTTCCCATAAGCAATAATGTTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAAAACAATCCAGATAAACCATTTAGAATCTTTCCGCTTCTAA</p>	<p>100%</p>	<p>100%</p>	<p>CP012142.1 CP001064.1</p>

	CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCAATGCTAACAGAAGTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGCCAGCAAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCAGGTATCTGTCTGTGTACTTCATCATAATAA			
27	ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGtttGcAAAAtAtGATAAATAAAGACAACGTCTCTGTTGAGACAAtCCAGTCTcTATTGCACTCAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTTATTAATCTAAATTTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTTAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCTGCTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATTTTTTTATATTTcAATGAAATGATTTTTTCATTCCGAAAAAAGCAGAgCACTAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGGATTTTGTCAATTCAGCTTTATGATCCC TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTccAtttTTTTGTCCAAGTGTCTGTCTATTCTTCAGGTGTAATATTTTCATTTTTTATTATTCCA TATAAGTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCAATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTCCCATAAAGCAATAATTGTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAACAATCCAGATAAACCATTAGAATCTTTTCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCAATGCTAACAgAAGTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGCCAGCAAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAgTCCGGGTATCTGTCTGTGTACTTCATCATAATAATAAGCGGTGAGCAAAATTTTCAGCTTATTGTATTTCGATATTTATTGCTCTCTT CTTGAGAAGCCTTCCGTATGTTTTGATAGTTTCTGCATGCCATTTT	100%	100%	CP012142.1
27DZL	ATGCCATCAGTAAATTTAATCCCATCAAGGAAAATATGTTTTGCAAAAATATGATAAATAAAGACAACGTCTCTGTTGAGACAATCCAGTCTCTATTGCACTCAAACA ATTGCCATATTTTTCTGACAAGAGGAGTTTTTTATTAATCTAAATTTGCCAAGTTACCGATCACTCTGGAAGACTTATTGTCTGTGCACATTTAGCTTCCCTACTGGA TAGCACAGTTTAAACAAAAGTAGTGGTCACGTGGATTATCATCACTTTGCTTTTCCGGATGAAATTAATAATATGTTTCAGTGAGTGAAGAAGAAAAGGCTATTAAT GTGCTGCTATTTATTTTGTGAAAACGGTTCATGGGGAGATATTTTTTTATATTTTCAATGAAATGATTTTTTCATTCCGAAAAAAGCAGAGCACATAGAAAT AAGTACATCAAATCACAATATGGCATTAGGCTTGAAGATTAAGAACTAAAAATGGGGGGGAtTTTGTCAATTCAGCTTTATGATCCCAACCATAACAGCAACTCATT TACGAGCAGAGTTTAAACAAATTTAACTTAGCTAAAAATAAAAAACTGACTGTAGATAATTTTCTTGATGAAAAACATCA TCAGCTTTTTATATTCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTccAtttTTTTGTCCAAGTGTCTGTCTATTCTTCAGGTGTAATATttTCATTTTTTATTATTCCA TATAAGTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCAATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTCCCATAAgCAATAATTGTTCTACACATCCaTTATGCAAGGCTACAACAATCCAGATAAACCATTAGAATCTTTTCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCAATGctAACAgAAgTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGCCAGcAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGCTAA	99%	100%	CP012142.1
36	TCAGCTTTTTATAtCTTCATAATTTCTAGAAAATCACTTccattttTTTTgtCCAAGTGTCTGTCTATTCTTCAGGTGTAATATTTTCattTTTTATTATTYCCA TATAAGTTTTTATTGCCTCAAAATTCCTATTTTGAAAAGCTATAATTAATCCAGATACCCCAATTTGGGCCTTCTGCTGCCAGTAATTTTGATGCCTGATGTGGAGTA AGGTCTGCAGTGTGAAGTATTTCCCATAAAGCAATAATTGTTCTACACATCCATTATGCAAGGCTACAACAATCCAGATAAACCATTAGAATCTTTTCGCTTCTAA CAGCTCTGCTTTTTTATCCAAGTTAAGTTTTGCCTCATTCAAGATATCACCATAAGCTAAGATTGCATCAGCCTGTCCATTATTCAATGCTAACAGAAGTCCGGGAA CATTGTATATCTCCTTGAGGCCAGCAAAATTTACAATATCCTCTGAGTTGAGGAGAGGGGGCTAAGAATGAGCTCACCGTATGCGCGTATAGCATCTGCATGTCCA TTTTGAAGAGCAAACATTAGTCCGGGTATCTGTCTGTGTACTTCATCATAATAATAAGCGGTGAGCAAAATTTTCAGCTTATTGTATTTCGATATTTATTGCTCTCTT CTTGAGAAGCCTTCCGTATGTTTTGATAGTTTCTGCATGCCATTTTGAAGTCTTGGG	99%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>Set1B</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
05	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
07	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
09	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
11	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
14	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
15	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
16	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
17	TCA CGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAAACAGCCATATCACA CTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGGATAAAAAATGACGGAAC AGGAAATTATGTCATTCCGGAGGAAGGTACCTCTGTCCC GGACACCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACGCTGAAC CAT	100%	100%	CP012142.1
26	ATG GTTCAGCGTAATATTCCCTTCATACTGGCTCCTGTGTCATTACGGGTGTCCGGGACAGAGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTC CGTCATTTTTATCCACAAATGCCCTGTCACTTCCAGTGTGATATGGCTGTTATCCGACTTAATGTCACTGTTTCAGCGAGGCGTTACG TGA	100%	100%	CP012142.1
27	ATG GTTCAGCGTAATATTCCCTTCATACTGGCTCCTGTGTCATTACGGGTGTCCGGGACAGAGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTC CGTCATTTTTATCCACAAATGCCCTGTCACTTCCAGTGTGATATGGCTGTTATCCGACTTAATGTCACTGTTTCAGCGAGGCGTTACG TGA	100%	100%	CP012142.1
27DZL	ATG GTTCAGCGTAATATTCCCTTCATACTGGCTCCTGTGTCATTACGGGTGTCCGGGACAGAGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTC CGTCATTTTTATCCACAAATGCCCTGTCACTTCCAGTGTGATATGGCTGTTATCCGACTTAATGTCACTGTTTCAGCGAGGcGTTACG TGA	100%	100%	CP012142.1
36	ATG GTTCAGCGTAATATTCCCTTCATACTGGCTCCTGTGTCATTACGGGTGTCCGGGACAGAGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTC CGTCATTTTTATCCACAAATGCCCTGTCACTTCCAGTGTGATATGGCTGTTATCCGACTTAATGTCACTGTTTCAGCGAGGcGTTACG TGA	100%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaB</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>3' TAATGTAAGCACCACAACCACTGGTTTTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGaGACAATACTATCCAAGCTGCAAAATGATGCAGCTAACAAATT ATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAAGTCAT TAAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGTGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCCCAG CAACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAACACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCCAGAGACTATGAAAAACAATAAATAAACT AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGAGTCACCAGAAAAGAAAAAATTAAGCC GGAAGAAATACAACCTACTATCAAAAAAGACGCAGCAGTTAAAGACAGGACATTGATTGAGCAGAAAACCCGTGCAATTCATAGCAAACTTACAGATAAATCAATG CAACTCGAAAAAGAAATAGACTCTTTTTCTGCATTTTCAAACACAGCATCTGCTGA; TCAAGCAGTAGtttGTTGCAAAATTGCTTTTGCAACATCAGTTCTATTAGCCTGaGAGTTGGACATTGAGGCTAAaAGaTCTGCaATTACTTCTGCAATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAGTTGTTCAACTTGATATTTTCGATAATGTCAGGTC</p>	100%	100%	CP012142.1
07	<p>3' TAATGTAAGCACCACAACCACTGGTTTTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGaGACAATACTATCCAAGCTGCAAAATGATGCAGCTAACAAATT ATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAAGTCAT TAAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGTGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCCCAG CAACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAACACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCRGAGACTATGAAAAACAATAAATAAACT AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGAGTCACCAGAAAAGAAAAAATTAAGCC GGGaAGAAATACAACCTACTATC; TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAACATCaGTTCTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAAaAGMTCGCRATTACTTCTGCAATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAGTTGTTCAACTTGATATTTTCGATAATGTCAGGTCGTGATATTGTGCGACGCGCTGTCTGAAAAACAGCAGAA GGCACACTTCCCTCCGCTTGTGTTGGCAGATTAACTTTCTCTCTTAATAAAACTGCTTGG</p>	99%	100%	CP012142.1
09	<p>3' TAATGTAAGCACCACAACCACTGGTTTTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGaGACAATACTATCCAAGCTGCAAAATGATGCAGCTAACAAATT ATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAAGTCAT TAAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGTGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCCCAG CAACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAACACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCaGAGACTATGAAAAACAATAAATAAACT AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGAGTCACCAGAAAAGAAAAAATTAAGCC GGGaAGAAATACAACCTACTATCAAAAAAGACGCAGCAGTTAAAGACAGGACATTGATTGAGCAGAAAACCCGTGCAATTCATAGCAAACTTACAGATAaATCAATG CAACTCGAAAAAGAAATAGACTCTTTTTCTGCA</p>	100%	100%	CP012142.1
11	<p>3' AATGTAAGTACCACAACCACTGGTTTTGCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAGGCTGCAAAATGATGCAGCTAACAAATTA TTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAAGTCAT AAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGTGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCTCAGC AACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGaATTCTCCGATAAAAATTAATACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCCAGAGACTATGAAAAACAATAAATAAACTA AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGATTCCACCAGaaAGAAAAAATTAAGCCG GGAAGAAATACAACCTACTATCAAAAAAGACGCAGCAGTTAAAGACAGGACATTGATTGAGC; TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAACATCaGTTCTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAAaAGMTCGCAATTACTTCTGCaATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAG</p>	99%	100%	AF330459.1 CP012142.1
14	<p>3' aTGcATAATGTAAGTACCACAACCACTGGTTTTGCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAGGCTGCAAAATGATGCAGCTAAC AAATATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAA GTCATTAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGWGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGT CTCAGCAACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAATACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCCAGAGACTATGAAAAACAATAAAT AAATAAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGATTCCACCAGaaAAGaaAAAAAT AAGCCGGGAAGAAATACARCTACTATCAAAAAAGACGCAGCAG; TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAACATCaGTTCTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAAaAGMTCGCAATTACTTCTGCaATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAG</p>	99%	100%	AF330459.1 CP012142.1
15	<p>3' AATGTAAGCACCACAACCACTGGTTTTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGaGACAATACTATCCAAGCTGCAAAATGATGCAGCTAACAAATTA TTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAACCTAATGCACACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAAGTCAT AAATGCAAGTTCCCACTAACGCTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACCTGGTGA AAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCCCAG AACAGGCAAGACAGCAAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAACACTCTTCTATCTGAAACTGAAGGACTAACCaGAGACTATGAAAAACAATAAATAAACTA AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGAGTCACCAGAAAAGAAAAAATTAAGCCG</p>	100%	100%	CP012142.1

	GGaAGAAATACAACCTACTATCaAAAAAGACGCGAGCAGtTaaAGACAGGACATTGATGAGCAGAAAACCCCTGTC			
16	3' TAATGTAAGCACCACAACCCTGGTTGCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAGGCTGCAAAATGATGCAGCTAACaAATT ATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACAAAAATATTAATACAACCTAATGCaCACTCAACTTCaAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAGTCAT TAAATGCAAGTtCCCACTAACGCTTTTAATTGGAAACCTTATTCAAACTACTCGGWGAAAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTGCAAGTCCCAG CAACAGGCAAGACAGCAAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAATACTCTTCTATCTGAACTGAAGGACTAACCAGAGACTATGAAAAACAAATTAATAAACT AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAAATAAAATTAACCAAAATTCAAACAAGATTATCCGAACCTCGACCCAGATTACCAGAAaATAAAAAATTAAGAC GgG; TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAaCATCAGTCTTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAACAGCTCTGCaATTACTTCCTGCaATTGGCCGA ATTTTCTATTGCGtCaCCGATGTATTTTGACAGKTGTTCAACTTGATATTTTCGATAATGTCAGGCTCTGCTAGATTTTTCGACGCGTTGtTTTGGAAAACAGCaGAA GCGACATTTCCTCCCGCTTG	99%	100%	AF330488.1 CP001062.1
17	3' TAaTGTAAGTACCACAACCCTGGTTGTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAGGCTGCAAAATGATGCAGCTAACaAATT ATTTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACAAAAATATTAATACAACCTAATGCaCACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAAGTCAT TAAATGCAAGTtCCCACTAACGCTTTTAATTGGAAACCTTATTCAAACTACTCGGWGAAAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTGCAAGTCCCAG CAACAGGCAAGACAGCaAAAAACCTAGAATTCTCCGATAAAAATTAATACTCTTCTATCTGAACTGAAGGACTAACCAGAGACTATGAAAAACAAATTAATAAACT AAAAAACGCAGATTCTAAAATAAAAGACCTAGAAAAATAAAATTAACCAAAATTCAAACAAGATTATCCGAACCTCGCCCGAGATTACCAGAAaAAGAAAAATTAAGCC GGGAAGAAATACAACCTACTATCA; TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAaCATCAGTCTTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAATAGATCTGCaATTACTTCCTGCaATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAGtTGTTCAACTTGATATTTTCGATAATGTCAGGCTCTGCTAGAtTTGTCGACGCGCTGtTCTGGAAAACAGCAGAA GCGACACTTCCTCCCGCTTGTGTGGMAGAGTTAACACTTTCTCCTAATAAAACTGCTTGGTTTAAATGGGtGGAAATAAATTG	99%	100%	AF330459.1 CP012142.1
26	3' TATTTtCTCTTACARTTGCTGATCTTACTGCTAACAAAAAnATTAATaCAACTAATGCACACTCAACTtCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCaaAGT CATTAATGCAAGTtCCCACTAACGCTTTTAAKTGGAAACCTTATTCAAACTACTCGGtGAAAAATCTTTAACTGCATTAAACAAATAAAATTAAGCTTGGAAAGTCT CAGCAACAGGCAAGACAGCAAAAAACCTAG;	99%	100%	AF330486.1
27	TCAAGCAGTAGTTTGTGCAAAATTGCTTTTGCAACATCAGTCTTATTAGCCTGAGAGTTGGACATTGAGGCTAATAGaTCTGCaATTACTTCCTGCaATTGGCCGA ATTTTCTATTGCTTCACTGATATATTTTGACAGTGTTCaACTTGATATTTTCGATAATGTCAGGCTCTGCTAGATTTGTCGACGCGCTGtTCTGGAAAACAGCAGAA GCGACACTTCCTCCCGCTTGTGTGGCAGAGWTAACACTTTCTCCTAATAAAACTGCTTG	99%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH1</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGtTTaTTTccAcATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATtTgTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGG</p>	99%	100%	CP012142.1
05	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTCTTTATTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCCCTTTACCTAGGAGACTGCTACTCTTTTGGCATATAGCAATAGATTAGCAACTTACCAA</p>	99%	100%	CP012142.1
06	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTCTTTATTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCCCTTTACCTAGGAGACTGCTACTCTTTTGGCATATAGCAATAGATTAGCAACTTACCAA</p>	99%	100%	CP012142.1
07	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTCTTTTGGACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGNTtAtTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTcCGaAtGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGNGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAG</p>	99%	100%	CP012142.1
11	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAATATTTTCATCCTGtTTaTTTccAcATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCnCTTTCCTCGTTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTRTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACaTTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAAGCTTGagGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTcCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP014099.1
14	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAATATTTTCATCCTGtTTaTTTccAcATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCnCTTTCCTCGTTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTRTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACaTTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAAGCTTGagGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTcCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP014099.1
15	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGtTTaTTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAAAGCTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCaCTAAG</p>	99%	100%	CP012142.1

	CGCAGAGtATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGnTAGGAACAACGAACTGCAAACCTCTTCcATCTCTGCCTTCTAATC TtAAGATACTTAAGGTTGCGCACAACCATCTTACTGAACTGCC			
16	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAATATTTTCATCCTGtTtTaTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAA ACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCG TTACCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAA TTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTRTCTAATAACTTTGGATGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAA GCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACTCTTGAATTTAAAAAAGCTTGAGGnTAGgAACACGAACTGCAAACCTTnCCATCTCTGCCTTCTAAT CTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAACCATCTTACTGAACTGCCCTTTTACCTAGGAGACTGCAACTTCTTTT	99%	100%	CP014099.1
17	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTtntTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTGTCCGAATGGATGATTGGGAGAAA CAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTgGCTTTCCTCGCTA CCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGAtGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATaTTAAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAAATTT CTTAACACATATATCTGCATTACCACATTAATAAATTTGGaTGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCaAATCaCTAAGCG CAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGWTAGgAACACGAACTGCAAACCTCTtCCATCTCTGCCTtCTAATCT	99%	100%	CP012142.1
26	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTtntTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTGTCCGAATGGATGATTGGGAGAAA CAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTgGCTTTCCTCGCTA CCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGAtGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATaTTAAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAAATTT CTTAACACATATATCTGCATTACCACATTAATAAATTTGGaTGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCaAATCaCTAAGCG CAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGWTAGgAACACGAACTGCAAACCTCTtCCATCTCTGCCTtCTAATCT	99%	100%	CP012142.1
27	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTtntTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTGTCCGAATGGATGATTGGGAGAAA CAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTgGCTTTCCTCGCTA CCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGAtGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATaTTAAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAAATTT CTTAACACATATATCTGCATTACCACATTAATAAATTTGGaTGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCG CAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGWTAGgAACACGAACTGCAAACCTCTtCCATCTCTGCCTtCTAATCT	99%	100%	CP012142.1
27dzl	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTTtntTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAA ACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGCT ACCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGAtGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCnTACTGATTTACCTGAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAAAT TCTTAACACATATATCTGCATTACCACaTTATCTaATAACTTTGGaTGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCaCTAAGC GCaGAGtATaTAGGKTATCCACACTGCCTTCATTAC	99%	100%	CP012142.1
36	ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGCTTTTAAACAGATATCAGCACAATTACATCCCCAACCATTTATTTnTCCGAATGgGATGATTGGGAGAA ACAGGGGTACCAGGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTCCTCGC TACCTGTACTCCCTGCTTGCATTA AAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAAATTAACCATCCTnACTGATTTACCTGAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAAAT TTCTTAACATATATATCTGCATTACCACATTAATAAATTTGGATGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAG CGCAGAGnATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCTTGAATTTAAAAA	99%	99%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH2.5</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGAttAAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATC TTGTAATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGTGAATGGGAAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTGAAAAATATGTTTGCAAAATC AAGGGGGCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACaCTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCT GATTTCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCaACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGgGTGATAACAAGAT AAAAGAATTACCATATCTCcTGAACCTCTAACTCATTACGGATCCATAATAACCGATTGCATATTCTGcCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGTTT CTGGAAACAGAtTAGACaGCATCccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGG</p>	99%	100%	CP012142.1
05	<p>ATGAttAAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATC TTGTAATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGTGAATGGGAAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTAAAAATATGTTTGCAAAATC AAGGGGGCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACACTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCT GATTTCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGgGTGATAACAAGAT AAAAGAATTACCATATCTTCCtGAACCTCTAACTCATTACGGATCCATAATAACCGATTGCATATTCTGCCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGTTT CTGGAAACAGATTAGACaGCATCccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGG</p>	100%	100%	CP012142.1
07	<p>ATGAttAAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATC TTGTAATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGTGAATGGGAAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTAAAAATATGTTTGCAAAATC AAGGGGGCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACACTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCT GATTTCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGGGTGATAACAAGAT AAAAGAATTACCATATCTTCCtGAACCTCTAACTCATTACGGATCCATAATAACCGATTGCATATTCTGCCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGTTT CTGGAAACAGATTAGACAGCATccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGGCTGGCTCTGGCTAATAATTTTATAGAACaACTACCGGA; 3 TCaGGcCAGtACCTCGGCAGTCAACTGACGTAATCTGCTGCTCAGCTCAGCTGTCaCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCCCGCTCAGACC TGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGtACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCCA</p>	100%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGAttAAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATC TTGTAATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGtGAtgGnAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTGAAAAATATGTTTGCAAAATC AAGGGGGCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACaCTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCT GATTTCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGGGTGATAACAAGAT AAAAGAATTACCATATCTTCCtGAaACTCTAACTCATTACGGATcCaTAATAACCGATTGCATATTCTGCCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGtTT CTGGAAACAGAtAgACAGCATccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGGCTGGCTCTGGCTAATAATTTTATAGAACaACTACCGGA; 3 GgtCAGCCACCCTCTGAGAGtACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCAGcGGKcAGcTTCCTGACGCTTCAGtACAGCAtGCCAtG GtCCCCAGAGGgAGAACCAGtCCGtAAATTCATTCTCTTACGGcTtCTGACCATTGGCTTCGGCAGtGCGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAgAAA CGGATTTCTTCCAGGCAGTAGAGAGTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGG</p>	99%	100%	CP012142.1
26	<p>5' AAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATCTTGT AATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGTGAATGGGAAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTAAAAATATGTTTGCAAAATCAAGG GCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACACTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCTGATT TCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGGGTGATAACAAGATAAAA GAATTACCATACTTCCtGAAACTCTAACTCATTACGGATCCATAATAACCGATTGCATATTCTGCCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGTTTCTGG AAACAGATTAGACAGCATccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGGCTGGCTCTGGCTAATAATTTTATAGAACaACTACCGGA; 3 TCAGGCCAGTACCTCGTCAGTCAACTGACGgTAAATCTGCTGTTcAGTCTCAGCATCACCTGTGCACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCCCGCTCAGACC TGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCAGcGgtCAGCTTCCGTACGCTTcAGtA CAGCATGCCATGgtCCCCAGAGGgAGAACCAGtCCGTAAATTCATTCTTCTTACGGCTTCTGACCATTGGCTTCGGCAGtGCGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGAC ACGCCATAGAAACGCATTTCCCTCACC</p>	100%	100%	CP012142.1
27dzl	<p>5' AAATCAACGAATATACAGGTAATCGGTTCTGGTATTATGCATCAAATAAACAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATCTTGT AATGAATATTATTTAAAAGTCTGGAGtGAtgGnAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGcaATATCGCCTTCAATAGGCTAAAAATATGTTTGCAAAATCAAGG GCGGAATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCCTCAGATAACAACACTGGAAATAAGAAAAAACCTATTAACATATCTCCCTGATT TCCCACCAATGCTTAAGGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGGGTGATAACAAGATAAAA GAATTACCATACTTCCtGAAACTCTAACTCATTACGGATCCATAATAACCGATTGCATATTCTGCCACTATTGCCACCGGAGCTAAAATTACTGATAGTTTCTGG AAACAGATTAGACAGCATccccCTTCCAGATAAGCTTgAAGGGCTGGCTCTGGCTAATAATTTTATAGAACaACTACCGGA; 3 GgtCAGCCACCCTCTGAGAGtACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCAGcGgtCAGCTTCCGTACGCTTcAGtA CAGCATGCCATGgtCCCCAGAGGgAGAACCAGtCCGTAAATTCATTCTTCTTACGGCTTCTGACCATTGGCTTCGGCAGtGCGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGAC ACGCCATAGAAACGCATTTCCCTCACC</p>	99%	100%	CP012142.1

27	<p>5' AGGAATATACAGGTAATCGGTCTCTGGTATTATGcATCAAATAAACATACACTCGTAACTCTATTTTCTTTGCCTGTGAGTTTGAGTCCATCTTGTAATGAA TATTATTTAAAAGTCTGGAGTGAATGGGAAAAGAACGGTACCCAGGCGAGCAACGnAATATCGCCCTCAATAGGCTAAAAATATGTTTGGAAAAACAAGGGGCGGA ATTAATCTATCTGAGTTAGATTTAAAACATTACCTGATTTACCGCTCAGATAACAACaCTGGAAATAAGAAAAACCTATTAACATATCTCCCTGATTTCCAC CaATGCTTAAGTAATACATGCTCAATTTAATCAACTGGAAAGCTTACCTGCCTTACCCGAGACGTTAGAAGAGCTTAATGTGgGnTGATAACAAGATAAAAAGnAT TACCATATCTTCTGAAACTCTAACTCATTACGGCTG</p>	99%	100%	CP012142.1
----	--	-----	------	------------

ISOLADO	GENE <i>IpaH7.8</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGTTCTCTGTAATAATACACACTCATCAGTTTCTTGCTCCCCCTCTATTAACCTCAAACCTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATACCAGAACTTCTTGAGTCATTAACAACCTTAAGTGTTCGTTCACTCAACTGGAAAACCTTCTGTTTTGCCAAACCTTAACATCATTATT TGTTGAAAATAACAGGCTATATAAAGTACCGGCTCTTCCCGAAAAATGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACAACATTACCCGACTTACCCGATAAAC TGAAATTTCTGTGCTCAGCGCAATAATCTGGTTACTTTTCTCAATTTTCTGATAGAAAACAATATCAGACAAAAGGAATATTATTTTCATTTTAAATCAGATAACC ACTCTTCCGGAGAGTTTTTACAATTAGATTCAAGTTACAGGATTAATATTTTCCAGGGAATCCATTGTCGACTCGCGTTCTGCAATCCCTGCAAGATTAACCTCTTC GCCGACTACCAC; 3 TTAGAaTGGTGCAGTCGTGAGCCGTTTTTCCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAACTGACGGTAAATCTGCTGTTTCACTCTCACGCATCACCTGTGC ACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTT CTGCCTGCGCCAGCGTCAGCTTCCGTACGCTTCCAGTACAGCATGCCATGGTCCCGAGAGGGAGAACCCAGTCCGTAATTCATTCTTCCAGGCTTCTGACCATG GCTTCCGAGTCCGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACAGCCATAGAAAACGCATTTCTTCCAGCGCAGTAGAGAGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAA GCCAGGTAGACTTCTATCTCATCCAAAAATGGAGAGTTTCTGACTTTaTCCCGGGCAATGTCTCCaGAATTTCSAGGCGGAACA;</p>	99%	100%	CP012142.1
07	<p>ATGTTCTCTGTAATAATACACACTCATCAGTTTCTTGCTCCCCCTCTATTAACCTCAAACCTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATACCAGAACTTCTTGAGTCATTAACAACCTTAAGTGTTCGTTCACTCAACTGGAAAACCTTCTGTTTTGCCAAACCTTAACATCATTATT TGTTGAAAATAACAGGCTATATAAAGTACCGGCTCTTCCCGAAAAATGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACAACATTACCCGACTTACCCGATAAAC TGAAATTTCTGTGCTCAGCGCAATAATCTGGTTACTTTTCTCAATTTTCTGATAGAAAACAATATCAGACAAAAGGAATATTATTTTCATTTTAAATCAGATAACC ACTCTTCCGGAGAGTTTTTTCAC</p>	100%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGTTCTCTGTAATAATACACACTCATCAGTTTCTTGCTCCCCCTCTATTAACCTCAAACCTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATACCAGAACTTCTTGAGTCATTAACAACCTTAAGTGTTCGTTCACTCAACTGGAAAACCTTCTGTTTTGCCAAACCTTAACATCATTATT TGTTGAAAATAACAGGCTATATAAAGTACCGGCTCTTCCCGAAAAATGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACAACATTACCCgACTTAcCGGATAAAC TGAAAATTTCTCTGTG</p>	100%	100%	CP012142.1
11	<p>ATGTTCTCTGTAATAATACACACTCATCAGTTTCTTGCTCCCCCTCTATTAACCTCAAACCTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATACCAGAACTTCTTGAGTCATTAACAACCTTAAGTGTTCGTTCACTCAACTGGAAAACCTTCTGTTTTGCCAAACCTTAACATCATTATT TGTTGAAAATAACAGGCTATATAAAGTACCGGCTCTTCCCGAAAAATGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACRACaTTACCCGACTTACCCGATAAAC TGAAAATTTCTCTGTGCTCAGCGCAATAATCTGGTTACTTTTCTCAATTTTCTGAT; 3 TTAGAaTGGTGCAGTCGTGAGCCGTTTTTCCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAACTGACGGTAAATCTGCTGTTTCACTCTCACGCATCACCTGTGC ACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCgTATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTT CTGCCTGCGCCAGCGGTCARCTTCCGTACGCTTCAgTAcnGCATGCCATGGTCCCGAGAGGGAGAACCaGTCTCT</p>	99%	100%	LC111511.1 LC111512.1

14	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAACACTCATCAGTTTCTTGTCTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTCAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATAcCA</p>	100%	100%	LC111511.1
15	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAACACTCATCAGTTTCTTGTCTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATAACCAGAACTTCCCTGAGTCATTAACAACCTTAAAGTGTTCTTAATCAACTGGAAAACCTTCCTGTTTGGCAAACCATTTAACATCATTAT TGTGAAAATAACAGGCTATATAACTTACCGGCTCTTCCCGAAAATTTGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACaACATTACCCGACTTACCGGATAAAC TGGAAATTCCTGTGCTCAGCGCAATAATCTGGTTACTTTTCT</p>	100%	100%	CP012142.1
16	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAACACAnTcAtcAGTtTcTtGCTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAAtgAacAttATCTGAGAATCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTaaacagACTctcCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGtATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATAACCAGAACTTCCCTGAGTCATTAACAACCTTAAAGTGTTCTTAATCAACTGGAAAACCTTCCTGTTTGGCAAACCATTTAACATCATTAT</p>	99%	100%	CP012142.1
17	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAACACTCATCAGTTTCTTGTCTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAcAgACTCTCCAGTGCTTTC; 3 ATATGAaTGGTGCAGTCGTGAGCCGTTTTTCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAGCTGACGGTAAATCTGCTGTTTCTGCTCAGCATCACCTGTGC ACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTCTGAGGGTACTCATTCTCCAGCATCTCATATTTCTGCTTTT CTGCCTCGCCAGCCGTCAGCTTCCGTACGCTTCAGTACAGCATGCCATGGTCCCGAGGGGAGAACCCAGTCCGTAATTCATTCTTTCACGGCTTCTGACCGTG GCTTCGGCAGTCGGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCTTTCACGGCAGTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAA GCGCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCTCCAGAATTTTCGAGGGCGGAACA</p>	99%	100%	CP012142.1 CP011416.1
26	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAACACTcAtnAGTTTCTTGTCTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAAtgAACATTATCTGAGAATCTGACTGAATGGGAAAA GAACTCTTCTCCCGGGGAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAcAgACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTC TTCCCGAATTACCAAAGCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTCAAAGAACTTAATGCTGATAATAAC AGGCTTTCTGTGATAACCAGAACTTCCCTGAGTCATTAACAACCTTAAAGTGTTCTTAATCAACTGGAAAACCTTCCTGTTTGGCAAACCATTTAACATCATTAT TGTGAAAATAACAGGCTATATAACTTACCGGCTCTTCCCGAAAATTTGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACAAACATTACCCGACTTACCGGATAAAC TGGAAATTCCTGTGCTCAGCGCAATAATCTGGTTACTTTTCTGATAGAAACAATATCAGACAAAAGGAATATATTTTCAATTTTAAATCAGATAACC ACTCTTCCgGAGAGTTTTTACAAATTAGATTCAAGTTACAGGATTAATATTTTCAGGgAATCCATTGTGACTCGCGTTTGCATCCCTGCAAAGATTAACCTCTTC GCCGGACTACCAGCCCGCAGATTTACTTCTCCATGAGTGACGGA; 3 ATATGAATGGTGCAGTCGTGAGCCGTTTTTCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAACTGACGGTAAATCTGCTGTTTCTGCTCAGCATCACCTGTGC ACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGTATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTT CTGCCTCGCCAGCCGTCAGCTTCCGTACGCTTCAGTACAGCATGCCATGGTCCCGAGGGGAGAACCCAGTCCCTTAAATTCATTCTTTCACGGCTTCTGACCATG GCTTCGGCAGTCGGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCTTTCACGGCAGTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAA GCGCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCTCCAGAATTTTCGAGGGCGGAACATTTCCCTGCCAGGGAGAGCA GAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGCCCTTCTGATGCCTGATGGACCAGGAGGTTTTCCGGAGATTGTTCATGTGAGCGCGACACGGTCTCACAGCTCTCAGTG GCATCAGCAGCAACAGCGAAAAGACTGCTGTGCAAGCTCCCGCAGAGGCAGTGAATTTTCAGGACATGCAGCGACTGTTTCACGGAATCCGGAGGATTGCGTGCAGA</p>	99%	100%	C111512.1 CP011417.1
27	<p>ATGTTCTCTGTAATAATAAC4CTCCCTCTATTAACCTCAAACTCAACCAGTAATGAACATTATCTGAGAATCCTGACTGAATGGGAAAAGAACTCTTCTCCCGGG GAAGAGCGAGGCATTGCTTTTAAACAGACTCTCCAGTGCTTTCAGAATCAAGAAGCAGTATTAATTTATCAGACCTAAATTTGACGTCTCTTCCCGAATTACCAA GCATATTTCTGCTTTGATTGTAGAAAATAATAAATTAACATCATTGCCAAAGCTGCCTGCATTTCTTAAAGAACTTAATGCTGATAATAACAGGCTTTCTGTGATAC CAGAACTTCTGTAGTCATTAACAACCTTAAAGTGTTCTGTTCTTAATCAACTGGAAAACCTTCTGTTTTGCCAAACCATTTAACATCATTATTTGTTGAAAATAACAGG CTATATAACTTACCGGCTCTTCCCGAAAATTTGAAATTTTACATGTTTATATAACAGGCTGACAAACATTACCCGACTTACCGGATAAACTGGAAATTTCTCTGTGC TCAGCGCAATAATCTGTTACTTTTCTCAATTTTCTGATAGAAAACAATATCAGACAAAAGGAATATATTTTTCATTTTAAATCAGATAACCCTCTTCCGGAGAGTT TTTACAAATTAGATTCAAGTTACAGGATTAATATTTTCAGGGAATCCATTGTGACTCGCGTTCTGCAATCCCTGCAAAGATT; 3 ATATGAaTGGTGCAGTCGTGAGCCGTTTTTCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAACTGACGGTAAATCTGCTGTTTCTGCTCAGCATCACCTGTGC ACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCAGCCACCCTTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTT CTGCCTCGCCAGCCGTCAGCTTCCGTACGCTTCAGTACAGCATGCCATGGTCCCGAGGGGAGAACCCAGTCCGTAATTCATTCTTTCACGGCTTCTGACCATG GCTTCGGCAGTCGGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCTTTCACGGCAGTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAA GCGCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCTCCAGAATTTTCGAGGGCGGAACATTTCCCTGCCAGGGAGAGCA GAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGCCCTTCTGATGCCTGATGGACCAGGAGGTTTTCCGGAGATTGTTCATGTGAGCGCGACACGGTCTCACAGCTCTCAGTG GCATCAGCAGCAACAGCGAAAAGACTGCTGTGCAAGCTCCCGCAGAGGCAGTGAATTTTCAGGACATGCAGCGACTGTTTCACGGAATCCGGAGGATTGCGTGCAGA</p>	100%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH3</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGATTAATTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGCATATAAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACaACTTAATGKCAGC TATAAcAGACTTATTGAACTGCCTGCTTTGcCTCAAGGACTTAAAtTATTGAATGCGTCCCACAATCMAcTAATCACACTACCCACACTCCCCATATCTTTGAAAGGA GCTTCATG	99%	100%	CP012142.1
09	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGAttAAAtTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGcATATAAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATGG AAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGAC AACaTTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACAACCTAAATGtCAGCT ATAACAGACTTATTGAACTGCCTGCTTTG	99%	100%	CP012142.1
11	AAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATGGAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACG AACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGACAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAA	99%	100%	CP012142.1
14	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGAttAAATTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGcATATGAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCaATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACAGCTTAATGTCAGC TATAACAGACTTATTGAACTGCCTGCTTTGCCTCAnGGACTTAAATTTATTGAATGCGTCCCcAATCaACTAATCACACTACCCACACTCnCCATATCTTTGAAAGGA GCTTCATG	99%	100%	CP012142.1
15	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGATTAATTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGCATATAAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCaATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACAACCTAAATGTCAGC TATAAcAGACTTATTGAACTGCCTGCTTTGCCTCaAGGACTTAAATTTATTGAATGCGTCCCcAATCAACTAATCACACTACCCACACTCCCCATAT	99%	100%	CP012142.1
16	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGATtAAAtTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCcGCGcATATGAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACAACCTAAATGTCAGC	99%	100%	CP012142.1
17	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGATTAATTTCAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGcATATGAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGAcTAGTATcAtGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACACaGCTTAATGtCAGC TATAACAGACTTATTGAACTGCCTGCTTTGCCTCAAGGACTTAACTTATTGAATGCGtCCCACAATCAACTAATCACACTACCCACACTCCCCATATCTTTGAAAGGA GCTTcAtGTCTCaATAATCaAtTATGTTCTCTTCTGTTTTACCAGAACTACTGGAACA	99%	100%	HE616528.1
26	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGAttAAAtTTcAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGcATATGAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACaAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAAnCAAGAGACGAACCTGGAcTTGtCTGAATTAGGcCTGA CAACATTACCTGAAAnCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAnGCTtAACTCTCCCCATTGCTGCGTCCCTTACAC	99%	100%	CP012142.1
27	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGAttAAAtTTCAAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCcGCGcATATAAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAA	99%	100%	CP012142.1
36	ATGCTCCCGACAATAACAATCACAGAttAAAtTTcAAATTCGTTCTCCACTTATTCAATCGACACTAGCCGCGcATATGAAAATTATCTAACCCATTGGACTGAATG GAAAAATAACCGCATACAAGAAGAACAACGAGACATCGCTTTTCAGCGACTAGTATCATGTCTACAAAACCAAGAGACGAACCTGGACTTGCTGAATTAGGCCTGA CAACATTACCTGAAATCCCCCGGGAATTAATCAATTAATATAAGTAAAAATAATTTAAGCTTAATCTCCCCATT	100%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH4</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
06	ATGCTTCCTGTAAAtAATCCCCCCTATCCACTGGAAACgTCTCTTTTACaGAACtACaTCAATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGGGTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGSAAACTGCTTTTACCCGGcTCCAATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTcA GAtCTCTACCACGaTTGCTTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATAACCAACTATCAATGCTCccCGAGCTACCAAGGG	99%	100%	CP012142.1
07	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGAAACGTCTCTTTTACAGAActACATCAATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGGGTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGGAAACTGCTTTTACCCGGCTCCAATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCCTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATAACCAACTATCAATGCTCCCCGAGCTACCAAGGGcATTGAAAGAGCTGAATGCAAGC AGtAATCAATTAATCTGCACTTCTGAAtTACCAGTGTGCTGGAATATATAAAtGTGAGTGA	100%	100%	CP012142.1
09	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGAAACGTCTCTTTTACAGAActACATCAATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGgGTTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGGAAACTGCTTTTACCCGGCTCCAATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCCTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATAACCAACTATCAATGCTCCCCGAGCTACCAAGGGCaTTGAAAGAGCTGAATGCAAGC AGTAATCAATTAATCTGCACTTCTGAATTACCAGTGTGCTGGAATATATAAATGTGAGTGATAACCATTGTTGCTGCACTTCTGAATTACCTGCGTCACTAGAATA TATTAATGTAAGTGACAATCACCTGTCTGTACTTCCGAGGtTACCAATG	100%	100%	CP012142.1
14	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGAAACGTCTCTTTTACaGAACtACATCaATCGAcAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGGGTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGGAAACTGCTTTTACCCGGCTCCAATTATGTCTGGAGAACAGTGAAAcATCGTTGGAcTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCCTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATAACCAACTATC	100%	100%	CP012142.1
15	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGaaACGTCTCTTTTACaGAACtACaTcNATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGRGTTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGGAAACTGCTTTTACCCGGCTCCAATTATGTCTGGAGAaCAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCTTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATAACCAACTATCAATGCTCCCCGAGCTACCAAGGGcATTGAAAGAGCTGAATGCAAGc AGtAATCaAtTATCTGCACTTCTGAAtTACCAGTGWCGCTGGAATATATAAATGTGAGTGATAACC	99%	100%	CP012142.1
17	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGAAACGTCTCTTTTACAGAActACATCaATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGGGTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGgAAACTGCTTTTACCCGGCTCCAATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCTTGACCATCTTTGAT	100%	100%	CP012142.1
26	ATGCTTCCTGTAAAtAATCCCCCCTATCCaCTGGAAACGTCTCTTTTACaGAACtACATCAATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGgGTTGaATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGgAAACTGCTTTTACCCGGCTCCaATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGYTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCTTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAAT		100%v	CP012142.1
36	ATGCTTCCTGTAAATAATCCCCCCTATCCACTGGAAACGTCTCTTTTACAGAActACATCAATCGACAATGTTTACAATAATTATCTCTCCGAATGGGTGAATG GACTAAAAACAGCATTTCGGAGAAAACAGGGAAACTGCTTTTACCCGGCTCCaATTATGTCTGGAGAACAGTGAAACATCGTTGGACTTATCTTGTTTAGGTCTCA GATCTCTACCACGATTGCCTGACAATCTTGATGAAATTAATGTAAGCAATCAATGCTCCCCGAGCTAcCAAGGGcATTGAAAGAGCTGAATGCAAGC AGTAATCAATTAATCTGCACTTCTGAATTACCAGTGTGCTGGAATATATAAATGTGAGTGATAACCATTG	100%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH6</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGtTTaTTTccAcATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATtTgTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGGCCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTCTCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP012142.1
05	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGtTTaTTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCnCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTCTcCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP012142.1
07	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTTTaTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGnnCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGnTAGgAACAAACGAACTGCAAACCTCT</p>	99%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGNtTAtTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTcCGaAtGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGNGCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGnTAGgAACAAACGAACTGCAAACCTCT</p>	99%	100%	CP012142.1
11	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAATATTTTCATCCTGtTTaTTTccAcATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCnCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACaTTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGtATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAAGCTTGagGTTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTTcCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP014099.1
15	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGtTTaTTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGGCCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATaTTAAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCaCTAAGCGCAGAGtATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACcCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGnTAGGAACAACGAACTGCAAACCTTTCcATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCC</p>	99%	100%	CP012142.1
16	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAATATTTTCATCCTGtTTaTTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCGCCTTTCTCGCTTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGATGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCAAATCACTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACTCTGAAATTTAAAAAAGCTTGAGGnTAGgAACAAACGAACTGCAAACCTTnCCATCTCTGCCTTCTAATCTTAAGATACTTAAGGTTGCGCACAAACCATCTTACTGAACTGCCCTTTACTAGGAGACTGCAACTCTTTT</p>	99%	100%	CP014099.1
26	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTTTaTTCCACATATCAGCACAATTACATCCCCAACCAATTATTTGTCCGAATGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTACC</p> <p>CGAAGAACAGCGTACTGAGGCGGTAAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGGCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCAATAAAAAGCTTGATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAAATaTTAAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACATTATCTAATAA</p> <p>ACTTTGGaTGTGTCCGAAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGTTATTACCAGACACCATCaAATCaCTAAGCGCAGAGTATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGAGGWTAGgAACAAACGAACTGCAAACCTTtCCATCTCTGCCTtCTAATCT</p>	99%	100%	CP012142.1

27dzl	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTTTATTCCACATATCAGCACAAATACATCCCCAACCATATTTTGTCCGAATGGGATGATTGGGAGAAACAGGGGTTACCGGAAGAAGCAGCGTACTGAGGCGGTAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTGGGCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCATTAAAAAGCTTGAATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACACATATATCTGCATTACCACaTTATCTaATAAaCTTTGGaTGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGtTATTACCAGACACCATCAAAATCaCTAAGCGCaGAGtATaATAGGKTATCCACACTGCCTTCATTAC</p>	99%	100%	CP012142.1
36	<p>ATGCGAGAAATTAATATGCTCAGAAACATTTTCATCCTGTTTTAACAGATATCAGCACAAATACATCCCCAACCATATTTnTCCGAATGgGATGATTGGGAGAAACAGGGGTTACCGGAAGAAGCAGCGTACTGAGGCGGTAAGAAGACTTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGGGGCATAAACTGGACCTGCGAGCCTTGGCCTTTCTCGCTACCTGTACTCCCTGCTTGCATTAAAAAGCTTGTATGTGAGCTGTAATAAATTAACCATCCTTACTGATTTACCTGAAAATATTAAGAAGCTTATTGCAAGAGATAATTTCTTAACATATATATCTGCATTACCACATTAATAAaCTTTGGATGTGTCCGAAAATCAATTAGAGAATCTGCCGtTATTACCAGACACCATCAAAATCACTAAGCGCAGAGnATAATAGGTTATCCACACTGCCTTCATTACCCTTGAATTTAAAAAACTTGC GGAT</p>	99%	99%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>IpaH7</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCGGCACATACAAGAACTTAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTCCATCTTCCCTTGCACTCTCAGYCTTCTCAATA</p>	99%	100%	CP012142.1
05	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCGGCACATACAAGAACTTAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTCCATCTTCCCTTGCACTCTCAGCCCTTCTCAATARCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCGGCTCTACWAAAACCTTCTGTGG</p>	99%	100%	CP012142.1
06	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCGGCACATACAAGAACTTAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTCCATCTTCCCTTGCACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACRCTACCTGATCTTCCCGGCTCTACAAAACTTCTGT</p>	99%	100%	CP012142.1
07	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCGGCACATACAAGAACTTAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTCCATCTTCCCTTGCACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCGGCTCTACAAAACTTCTGTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAACCTACAGGAACCTAAGTGTCTTTGATAACAGATTACAAGCGCTA</p>	99%	100%	CP012142.1
09	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCGGCACATACAAGAACTTAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTCCATCTTCCCTTGCACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCGGCTCTACAAAACTTCTGTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAACCTACA</p>	99%	100%	CP012142.1
11	<p>ATGAAACCTGCCCAACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGTC TGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTAC</p>	99%	100%	CP012142.1

	TCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAgACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTTCACTTAAACAGAGTTtAAcATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAgcCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCcCGGCTCTACAaaAAC			
14	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTTCACTTAAACAGAGTTtAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATARcCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGG	99%	100%	CP012142.1
15	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTTCACTTAAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGGCTCTACAAAAAActTTCTGTTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAActACAGGAActAAGTGCTTTTGATAAcAGATTACAAGAGCTA	99%	100%	CP012142.1
16	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAgACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTcACTTAAACAGAGTTtAAcATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTcCAATARMCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCcCGGCTCTACAAAAAAct	99%	100%	CP012142.1
17	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAgCCAGCGATAAACAACTGAGCAGGCTcCCCGCTcTCCgCTCCTGATCTTCCcCGGCTCTAGATTAA	99%	100%	CP012142.1
26	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGGCTCTACAAAAAActTTCTGTTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAActACAGGAActAAGTGCTTTTGATAAcAGATTACAAGAGCTA	99%	100%	CP012142.1
27	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTTCACTTAAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGGCTCTACAAAAAActTTCTGTTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAActACAGGAActAAGTGCTTTTGATAAcAGATTACAAGAGCTACCGCCCTTCTCAAAATCTGAgGCTTTT	99%	100%	CP012142.1
27dzl	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAGCCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGGCTCTACAAAAAActTTCTGTTGGCAACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAActACAGGAActAAGTGCTTTTGATAAcAGATTACAAGAGCTACCGCCCTTCTCAAAATCTGAgGCTTTT	99%	100%	CP012142.1
36	ATGAAACCTGCCACAATCCTTCTTTTTTCCGCTCCTTTTGTGGTTTAGGATGTATATCCCGTTTATCCGTAGAAGAGCAAAATATCACGGATTATCACCGCATCTGGATAACTGGGCCAAGGAAGGTGCTGCAACAGAAGACCGAACACAGGCAGTTCGATTACTGAAAATATGCTGGCTTTTCAAGAGCCAGCCCTCAATTTAAGTTTACTCAGATTACGCTCTCTCCCATACCTGCCCCCGCACATACAAGAACTTAAACATCTCTAGCAATGAGCTACGCTCTCTGCCAGAACTCCCTCCGTCCTTAACGTACTTAAAGCCAGCGATAACAGACTGAGCAGGCTCCCGGCTCTTCCGCTCACCTGGTCGCTCTTGATGTTTCACTTAAACAGAGTTTAAACATGTTTGCCTTCTCTTCCATC TTCCTTGCACTACTCTCAGCCCTTCTCAATAgcCTGGAGACGCTACCTGATCTTCCCCCGGCTCTACAAAAAActTTCTGTTGGCaACAACCAGCTTACTGCCTTAC CAGAATTACCATGTGAActTACA	99%	100%	CP012142.1

ISOLADO	GENE <i>SenB</i>	BLASTN	QUERY	ACESSO
02	<p>ATGCCGTTAAATAAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCATTATGAGGGTCTCAAACCTCCAGTGAACATAATTCAGTTTAAGAATAAAACAGCACCTTATTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGGAGGTAATAATAAATGGAGTGGCAAAAGATAATATGGAAGACAAATAGTTTGGCCGTACCTAGCTTCTTATGGGAAATGAATTTTATGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAGCTTCTTAGCACCCCTGATGCTATTGCAAAAAATGTATGTTGGAAAAACGGGAAGATTTTCAAAATCACCAGCTTATATTTATTTTGTGGAAAAATAAAAAGTGGGGAACAGTTATTACTAATTTTTTTTATAACATGAAAAAAATGGAGACTTTGTCAGAACATTATCAGCATGCACATTAACCACCAAAATGGCGTTAGGGTTGAAAAATAAAGCCGTACAAGAAAGTGAAAATGGGTTGTTTCAGTTCCTAATCGAACTGTTACTCATAAACGTACTGTATTTACTTGTGATAGCCATTTTCAAACTGAGTCAATTTCCGCTAAGGATTTTTTTGATGATTTTTATTGGAAA</p> <p>Fw: TAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCtCtCTTGAAAATTGTCTGTATAGTATCCGGTCCAGATtGTTCTCTTTTATTA TTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGTCTT GTGGTAAAACATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAAATGCCATAAAAAAGTCTGTATGTACCGTTGGGATTTTTTAT CCaTAATAATTCATCTATATATTCCTGGTGGGggGag</p>	100%	100%	CP012142.1
05	<p>ATGCCGTTAAATAAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCATTATGAGGGTCTCAAACCTCCAGTGAACATAATTCAGTTTAAGAATAAAACAGCACCTTATTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGGAGGTAATAATAAATGGAGTGGCAAAAGATAATATGGAAGACAAATAGTTTGGCCGTACCTAGCTTCTTATGGGAAATGAATTTTATGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAGCTTCTTAGCACCCCTGATGCTATTGCAAAAAATGTATGTTGGAAAAACGGGAAGATTTTCAAAATCACCAGCTTATATTTATTTTGTGGAAAAATAAAAAGTGGGGAACAGTTATTACTAACTTTTTT TTAT</p>	100%	100%	CP012142.1
06	<p>Rv: TTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAaTAACAaGTTCTATTATGAGGGTCTCAaAcTcCagTGAACATAATTCAGTTTAAGAATAAAACAGC ACCTTATTTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGGAGTAAATATAAATGGAGTGGCAAAAGaTATATATGGAAGACAAATAGTTTGGCCGTACCTAGCTTCTTATGGGAAA TGAATTTTTATGGAACAAaTGGGAAGGTAACATATCAnCTTCTTAGCACCCCTGATGCTATTGCaAAAAATGTATGTTGGAAAAACGGGAAGATTTTTCAAAATC Fw: TCatAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCTTCTTTGAAAATTGTCTGCTATAGTATCCGGTCCaGATTGTnCTCTTTTA TTATTTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaTACCATCTTTATTAGTTGCGGACaGcATTTTCGACCAatCGT CTTGGGTAAAnCtAtAgTTTTTTAGAAATATAC</p>	99%	100%	CP012142.1
07	<p>Fw: TCaTAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCTTCTTTGAAAATTGTCTGCTATAGTATCCGGTCCAGATTTGTTCTCTTTTA TTATTTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGAAATACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGT CTGTGGTAAAACATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAAATGCCATAAAAAAGTCTGTATGTACCGTTGGGATTTTT TATCCATAATAATTCATCTATATATTCCTGGTGGGGGGGAG</p>	100%	100%	CP012142.1
09	<p>Fw: TCaTAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCTTCTTTGAAAATTGTCTGCTATAGTATCCGGTCCaGATTGTTCTCTTTTA TTATTTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaTACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGT CTGTGGTAAAACATAGTTTTTTAGAAATATTACaAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAAATGCCATAAAAAAGTC</p>	100%	100%	CP012142.1
11	<p>AtGCCGTTAAATAAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAgAACAAATAACAAGTTCATTATGAGGGTCTCaaAcTcCagTgAaCTaaTTCaGTTTaagAaATAAAaCagCaCCTTATTTTT</p> <p>TCaTAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCTTCTTTGAAAATTGTCTGCTATAGTATCCGGTCCAGATTTGTTCTCTTTTATTA TTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaTACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGTCTT GTGGTAAAACATAGTTTTTTAgAAATATTACAAA</p>	100%	100%	CP012142.1
14	<p>AtGCCGTTAAATAAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCATTATGAGGGTCTCAAACCTCCAGTGAACATAATTCAGTTTAAGAATAAAACAGCACCTTATTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGAAGGTAATAATAAATGGAGTGGCAAAAGATA ATATGGAAGACAAATAGTTTGGCCGTACCTAGCTTCTTATGGGAAATGAATTTTATGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAGCTTCTTAGCACCCCTGATGCT ATTGCAAAAAATGTATGTTGGAAAAACGGGAAGATTTTCAAAATCACCAGCTTATATTTATTTTGTGGAAAAATAAAAAGTGGGGAACAGTTATTACTAATTTTTTT TTATAaCATGAAAAAAATGGAGACTTTGTCAGAACATTATCAGCaTGCACaTTAAACCACCAAAATGGCGTTAGGGTTGAAAAATAAAGCCG</p> <p>TCaTAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTTcAtCtCtCTTTGAAAATTGTCTGCTATAGTATCCGGTCCAGATTTGTTCTCTTTTATTA TTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaTACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGTCTT GTGGTAAAACATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAAATGCCATAAAA</p>	100%	100%	CP012142.1 CP010830.1
15	<p>ATGCCGTTAAATAAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCATTATGAGGGTCTCAAACCTCCAGTGAACATAATTCAGTTTAAGAATAAAACAGCACCTTATTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGGAGGTAATAATAAATGGAGTGGCAAAAGATA ATATGGAAGACAAATAGTTTGGCCGTACCTAGCTTCTTATGGGAAATGAATTTTATGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAGCTTCTTAGCACCCCTGATGCT</p>	100%	100%	CP012142.1

	<p>ATTGCAAAAAATGTATGTTTGAAAAAACGGAAAGATTTTCAAATCACCAGCTTATATTTATTTGTGGAAAAATAAAAGTGGGGAACAGTTATTACTAATTTTTT TTATAACATGAAAAAATGGAGACTTTGTCAGAACATTATCAGCATGCACATTAAACCACCAAATGGCGTTAGGGTTGAAAAATAAGCGCGTACAGAAAGTGAAA AAATGGGTTGTTGAGTTTTCgATCCTAATCGAACTGTtACTCATAAACGTACTGTATTTACTTGTGATAGCCATTTcGAACTGAGTCAAtTATCCGCTAA TCAAAAAAATGATTAATCTATTTATTTCAATAAACGTTTTTTTcAtCTTCTTTGAAAAATGTTCTGCTATAGTATCCGGTTCCAGATTGTTCTCTTTTATTA TTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGTCCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGAATACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGTCTT GTGGTAAAACTATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAATGCCATAAAAAAGTCTGTGTACCCTGGGATTTTTTAT CCATAATAATTCATCTATAtATTCCTGGTGAGGGGGGAG</p>			
16	<p>Fw: TCATAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTcATCTTCTTTGAAAAATGTTCTGCTATAGTATCCGGTTCCAGATTGTTCTCTTTTA TTATTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGTCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGaaTACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGT CTTGTTGGTAAAACTATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGYAtGGCCATTATAAAATGCCATAAAAA</p>	99%	100%	CP012142.1
17	<p>Rv: ATGCCGtTAAATAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCGTTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCTAT TATGAGGTCTCAAACtCCAGTGAACtAATTCAGTTTAAAGAATAAACAGCACCTTATTTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGAAGGTAAATATAAATGGAGTGGCAAAAG ATATATATGGAAGACAAATAGTTTGCCGTCACCTAGCTTCTCTATTGGGAAATGAATTTTATGGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAGCTTCTTAGCACCCCTGAT GCTATTGCAAAAAATGTATGTTTGAAAAAACGGAAAGATTTTCAAATCACCAGCTTATATTTATTTTGTGGAAAAATAAAAGTGGGGAACAGTTATTACTAATTT TTTTTATaaCATGAAAAAATGGAgACTTTGTCAgAACATTATCagCaTGACATTAAACCACCAAATGGCGTTAGGGTTGAAAAATAAGCGCGTAC</p>	100%	100%	CP010830.1
26	<p>Fw: TCAAAAAAATGATTAATCTATTTATTATTTCAATAAACGTTTTTTTcATCTTCTTTGAAAAATGTTCTGCTATAGTATCCGGTTCCAGATTGTTCTCTTTTA TTATTCTACAATACTCTAATATTGTTTCTTTGTCTCTATTTACTACAGATACAAATACACCAGGAATACCATCTTTATTAGTTGCGGACAGCATTTCGACCAATCGT CTTGTTGGTAAAACTATAGTTTTTTAGAAATATTACAAAAGGCACGTATTGTTTCGGTATGGCCATTATAAAATGCCATAAAAAAGTCTGTGTACCCTGGGATTTTT TATCCATAAATAATTCATCTATATATTCTGGTGAGGGGGGAG</p>	100%	100%	CP012142.1
27	<p>Rv: ATGCCGtTAAATAAACATTTTCATCTAGTATATTTTCAACAAAAATTCgTATCAACAGATATGTCTGTTAACAGAGATAATAGAACAATAACAAGTTCTAT TATGAGGTCTCAAACtCCAGTGAACtAATTCAGTTTAAAGAATAAACAGCACCTTATTTTTTCAGAAAAGAGAAATGTGGAGGTAAATATAAATGGAGTGGCAAAAG ATATATATGGAAGACAAATAGTTTGCCGTCACCTaSCTTCTATTGGGAAATGAATTTTATGGAAACAAATGGGAAGGTAACATATCAnTCTTAGCACCCCTGAT GCTaTTGCAAAAAAtGtATGTTTGAAAAAAC</p>	99%	100%	CP012142.1