



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS AO
PROCESSO INVASIVO DE DIFERENTES
CEPAS DE *Shigella spp.* DE ORIGEM CLÍNICA

ALAN DE OLIVEIRA REZENDE

MANAUS - AMAZONAS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ALAN DE OLIVEIRA REZENDE

INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS AO
PROCESSO INVASIVO DE DIFERENTES
CEPAS DE *Shigella spp.* DE ORIGEM CLÍNICA

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

MANAUS - AMAZONAS

2016

Ficha Catalográfica

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

R467i Rezende, Alan de Oliveira
Investigação de genes de virulência associados ao processo invasivo de diferentes cepas de shigella spp. de origem clínica. / Alan de Oliveira Rezende . 2016
82 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Shigella. 2. Genes de virulência. 3. Invasão celular. 4. Disenteria. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ALAN DE OLIVEIRA REZENDE

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS AO
PROCESSO INVASIVO DE DIFERENTES
CEPAS DE *Shigella spp.* DE ORIGEM CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADO EM: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane

Profa. Dra. Najla Benevides Matos
Fiocruz Rondônia

Dr. Diogo Pereira de Castro
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisca Antônia de Oliveira Silva Rezende e Alex Antônio de Rezende, por me apoiarem em todas as horas, e à minha futura esposa, Jéssica Souza da Silva por todas as ajudas, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e por ter me mostrado esse caminho. Por me dar muita luz, sabedoria e discernimento nessa jornada.

Aos meus pais Francisca e Alex, por estarem sempre muito próximos, me apoiando, me aconselhando e me dando força. Ao meu irmão Gabriel, pela amizade, torcida e incentivo. À minha vovó querida Valdeci e ao meu vovô querido Nelson, por serem os pilares dessa família e que tanto me ensinaram ao longo da vida. Sei que posso contar sempre com vocês.

À minha amada futura esposa Jéssica, pela paciência, pela ajuda, amizade, carinho, amor e por sempre estar ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldade. Por ser minha companheira de todas as horas.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia, pessoa de extrema competência, um exemplo de profissional. Pessoa que eu admiro muito. Obrigado pelos ensinamentos, por me acolher, me orientar e por ser sempre tão prestativa. Obrigado pela dedicação e paciência na correção da dissertação.

Ao Professor Doutor Paulo, obrigado por todos os ensinamentos, dedicação e por contribuir para a minha formação profissional. Obrigado por toda a disponibilidade em me ajudar.

Aos colaboradores, Dra. Najla, Esquerdo, Dra. Stefanie, Dr. Luis Andre, Paula, Tatiana, Yury, o meu sincero obrigado pelos ensinamentos e por todas as contribuições ao longo dessa jornada.

A todos os colegas e amigos que integram o Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA), que me ajudaram de alguma forma na parte experimental.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), sempre empenhados, dedicados e comprometidos com a nossa formação. Obrigado por todas as contribuições e por fazerem parte desta conquista.

À Secretaria e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), o meu muito obrigado.

À FAPEAM e ao CNPq, obrigado pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

"A persistência é o caminho do êxito".

Charles Chaplin

RESUMO

As enterobactérias são as principais causas de disenteria em todo o mundo. Desta família, a *Shigella* merece destaque por ser o agente causativo da shigelose, doença entérica que atinge anualmente cerca de 165 milhões de pessoas, levando a óbito mais de um milhão, sendo crianças menores de cinco anos de idade a principal faixa etária afetada. Sua transmissão ocorre pela rota fecal-oral através da ingestão de alimentos ou água contaminados, ou contato entre pessoas, sendo mais efetivas em locais onde o saneamento básico é precário ou inexistente. Essas bactérias possuem o potencial de realizar o escape do sistema imune, invadindo e destruindo as células que revestem o intestino grosso, onde causam ulcerações na mucosa e diarreia com sangue e muco. Além da diarreia, a infecção desencadeia sintomas como febre, cólica abdominal e dor retal, geralmente a recuperação sem complicações desses pacientes ocorre dentro de sete dias. Durante os anos de 2007 a 2009, o grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia realizou um estudo epidemiológico avaliando os patógenos causadores de diarreia em crianças atendidas em hospitais públicos de Manaus - AM. Dentre os patógenos isolados, a *Shigella* foi identificada como o quinto maior agente causador de diarreia entre os casos encontrados. Estudos moleculares realizados com este patógeno identificaram variações entre as cepas isoladas na presença de genes de virulência chaves para a ativação da invasão e posterior manifestação clínica. Como todas as cepas de *Shigella* foram isoladas de casos de diarreia, nos questionamos sobre a relação desses genes com a invasão *in vitro*. Diante do exposto, foi utilizado caracterizamos gênero, espécies e genes de virulência de *Shigella* com a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), identificamos o perfil de resistência a antibióticos, também analisamos a capacidade invasiva dessas diferentes cepas de origem clínica, por meio dos testes *in vitro* em células fagocíticas e não fagocíticas, de forma qualitativa e quantitativa. Os resultados evidenciaram uma forte associação com a presença dos genes de virulência e a invasão celular das cepas de *Shigella* de origem clínica.

Palavras-chave: *Shigella*; Genes de virulência; Invasão Celular; Disenteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Modelo do LPS da <i>Shigella flexneri</i> 5A (M90T) e a diversidade do antígeno O.....	21
Figura 02: Incidência de shigelose por região geográfica, 1984-2005. Países que contribuíram com os dados de incidência: China, Tailândia, Egito, Bangladesh e Brasil.....	23
Figura 03: Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de <i>Shigella sonnei</i> isoladas na região metropolitana do Chile.	28
Figura 04: Mapa da ilha de patogenicidade de 30kb do plasmídeo.....	30
Figura 05: Representação esquemática do sistema de secreção do tipo III de <i>Shigella</i> no contexto de interação bacteriana com células epiteliais.....	31
Figura 06: Arquitetura do T3SS Mxi-Spa de <i>S. flexneri</i> . A agulha se destaca do corpo basal para a superfície bacteriana.	32
Figura 07: Entrada e disseminação da <i>Shigella</i> nas células epiteliais do intestino..	33
Figura 08: Amostras e materiais preparados para o teste de antibiograma, com a utilização de 8 cepas bacterianas (7 cepas selvagens e 1 cepa padrão) e 8 antibióticos.	39
Figura 09: Curva de crescimento bacteriano.....	41
Figura 10: Caracterização de gênero e espécies de <i>Shigella</i> , 7 cepas bacterianas e 5 genes (1 de gênero e 4 de espécies).	47
Figura 11: Caracterização de genes de virulência de <i>Shigella sp.</i>	48
Figura 12: Perfil de resistência a antimicrobianos.	49
Figura 13: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 5.	49
Figura 14: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 7.	50

Figura 15: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 11.....	50
Figura 16: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 14.....	50
Figura 17: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 15.....	51
Figura 18: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 17.....	51
Figura 19: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 27.....	51
Figura 20: Perfil de resistência a antibióticos da cepa M90T.	52
Figura 21: Curva de crescimento bacteriano com a cepa padrão <i>Shigella flexneri</i> 5A M90T.....	53
Figura 22: Invasão da cepa padrão <i>Shigella flexneri</i> 5A M90T em célula HEp-2. ...	54
Figura 23: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa M90T em célula HEp-2.....	55
Figura 24: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 05 em célula HEp-2.	55
Figura 25: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 07 em célula HEp-2.	56
Figura 26: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 11 em célula HEp-2.	56
Figura 27: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 14 em célula HEp-2.	57
Figura 28: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 15 em célula HEp-2.	57
Figura 29: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 17 em célula HEp-2.	58
Figura 30: Figura 29: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 27 em célula HEp-2.	58
Figura 31: Resultado do teste de invasão após 1 hora de indução das cepas M90T, 7, 15, 17 e 27 com a célula HEp-2.....	59
Figura 32: Resultado do teste de invasão após 3 horas de indução das cepas M90T, 7, 15, 17 e 27 com a célula HEp-2.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Relação dos grupos sorológicos com as espécies bacterianas e com os sorotipos.....	20
Tabela 02: Distribuição etária dos casos de diarreia.....	24
Tabela 03: Relação dos genes da <i>Shigella</i> e suas funções	32
Tabela 04: Relação dos genes alvos para caracterização de <i>Shigella spp.</i>	45
Tabela 05: Relação dos genes de virulência de <i>Shigella spp.</i>	46
Tabela 06: Perfil de resistência a antibióticos	49
Tabela 07: Teste de invasão com a HEp-2 em 1 hora, internalização bacteriana...	60
Tabela 08: Teste de invasão com a HEp-2 em 3 horas, internalização bacteriana .	60
Tabela 09: Teste de invasão com a HEp-2 em 1 hora, adesão bacteriana.....	60
Tabela 10: Teste de invasão com a HEp-2 em 3 horas, adesão bacteriana	60
Tabela 11: Teste de invasão com a J774 em 30 minutos, com adesão bacteriana..	61
Tabela 12: Teste de invasão com a J774 em 60 minutos, com adesão bacteriana.	61
Tabela 13: Esquema geral de todos os resultados obtidos neste estudo.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina + Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Células M	Células epiteliais membranasas
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Clorafenicol
CRO	Ceftriaxona
cm	Centímetros
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
GEN	Gentamicina
IL	interleucina
ipa	invasion plasmid antigens
LB	Luria-Bertani
LDC	Lisina Descarboxilase
LPS	Lipopolissacarídeo
Mxi-Spa	locus que codifica o T3SS

NAL	Ácido Nalidíxico
ORS	Sais de Reidratação Oral
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PAI	ilha de patogenicidade
PMN	Polimorfonucleares
rpm	rotação por minuto
shET	enterotoxina de <i>Shigella</i>
spp.	Espécies
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
Stx	Shiga toxina
T3SS	Sistema de Secreção Tipo III
TET	Tetraciclina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 <i>Shigella spp.</i>.....	20
2.1.1 Epidemiologia.....	22
2.1.2 Fatores de Risco, Prevenção e Controle.....	26
2.1.3 Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Tratamento.....	27
2.2 Mecanismos de Invasão.....	29
2.3 Fatores de Virulência da <i>Shigella spp.</i>.....	29
2.4 Invasão com <i>Shigella</i> em fagócitos e não fagócitos.....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. OBJETIVOS.....	37
4.1 Objetivo Geral.....	37
4.2 Objetivos Específicos.....	37
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Cepas Bacterianas e Condições de Crescimento.....	38
5.1.1 Antibiograma.....	38

5.2 Modelo de Célula.....	39
5.2.1 Cultura Celular.....	39
5.2.1.1 Cultivo das células HEp-2.....	39
5.2.1.2 Cultivo das células J774.....	40
5.3 Teste de invasão.....	40
5.3.1 Preparo das amostras bacterianas.....	40
5.3.1.1 Curva de crescimento bacteriano.....	41
5.3.2 Teste de invasão qualitativo.....	42
5.3.3 Teste de invasão quantitativo.....	43
5.4 Extração de DNA.....	43
5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
5.5.1 PCR de gênero e espécies de <i>Shigella</i>	44
5.5.2 PCR de genes de virulência de <i>Shigella</i>	45
6. RESULTADOS.....	47
6.1 Seleção e Identificação das Cepas Clínicas.....	47
6.2 Caracterização do Perfil de Virulência das Cepas de <i>Shigella</i>.....	48
6.3 Perfil de Resistência a Antibióticos.....	48

6.4 Curva de Crescimento.....	52
6.5 Teste de Invasão Qualitativo e Quantitativo.....	54
6.5.1 Células HEp-2.....	54
6.5.2 Células J774.....	61
7. DISCUSSÃO.....	62
8. CONCLUSÃO.....	68
9. CRONOGRAMA.....	69
10. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	70

1. INTRODUÇÃO

A *Shigella* é caracterizada por ser um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Este gênero possui quatro espécies distintas, todas patogênicas: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*. Conhecida por shigelose ou disenteria bacilar, sua manifestação clínica inclui diarreia com presença de muco e sangue, acometendo geralmente crianças menores de 5 anos. A principal rota de transmissão é a fecal-oral, sendo fortemente associada à falta de saneamento básico, ocorrendo principalmente nas regiões mais pobres (MARTEYN et al., 2012; SANSONETTI, 2001).

A *Shigella* é uma bactéria tipicamente invasora. Devido a sua habilidade de resistência ao pH ácido do estômago, a *Shigella* consegue chegar incólume ao intestino sendo capaz de invadir o epitélio do cólon e do reto em seres humanos, causando uma inflamação aguda da mucosa (JENNISON e VERMA, 2004; SANSONETTI, 2001). Para isso, são necessários fatores de virulência do sistema de secreção do tipo III (TSS3) (MARTEYN et al., 2012), especificamente as proteínas ipaA, ipaB, ipaC e ipaD, que são essenciais para a invasão em células epiteliais (JENNISON e VERMA, 2004).

Desde a sua descoberta em 1986 pelo Dr. Kiyoshi Shiga, a *Shigella* e os surtos de shigelose vem sendo estudados com a finalidade de entender melhor os fatores envolvidos na invasão, infecção e respostas do hospedeiro, bem como a epidemiologia. No Brasil, vários estudos têm sido realizados nas regiões sul e sudeste, porém na região Norte estes estudos estão limitados aos estados do Pará e Rondônia (BASTOS et al., 2012; BASTOS e LOUREIRO, 2010; ORLANDI et al., 2001).

Durante os anos de 2007 e 2009 o grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia realizou um estudo epidemiológico no qual foram recolhidas 1500 amostras diarreicas de crianças atendidas em hospitais públicos, com a finalidade de identificar os patógenos causadores de diarreia em Manaus - AM. Dentre eles, a *Shigella* foi identificada como o quinto maior agente causador de diarreia entre os casos encontrados. Estudos

moleculares realizados com este patógeno identificaram variações entre as cepas isoladas na presença de genes de virulência chaves para a ativação da invasão além de associações destes genes com a manifestação clínica. O gene shET-1B foi associado com complicações relacionadas a desidratação e o gene ipaH com febre e presença de sangue nas fezes. O fator de virulência mais frequentemente encontrado foi o gene ipaBCD, seguido do gene ipaH (CRUZ et al., 2014).

Cruz et al. (2014) também investigou genes de virulência associados ao processo invasivo de diferentes cepas de *Shigella* de origem clínica *in vitro*, bem como, também avaliou o processo inflamatório e a viabilidade celular após invasão destas em fagócitos e não fagócitos, associando os perfis de virulência com sua sintomatologia e epidemiologia.

Os dados provenientes deste estudo foram comparados com o padrão bem caracterizado, a cepa *Shigella flexneri* 5A – M90T – utilizada em inúmeros estudos para revelar detalhes da sua patogenicidade, bem como os mecanismos de invasão e os efeitos causados no hospedeiro (ONODERA et al., 2012; SANSONETTI et al., 1983; 1982).

Logo foi possível observar que a caracterização de amostras clínicas regionais quando comparadas com a cepa padrão bem caracterizada pode nos revelar informações importantes em relação a seu mecanismo de ação bem como a utilização dos fatores de virulência. Esse estudo pode ser aplicado no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, tratamentos terapêutico/preventivo e vacinas, destinados as especificidades regionais desta patogenia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Shigella spp.*

As *Shigellas* limitam-se ao trato intestinal dos seres humanos e outros primatas, onde provocam a disenteria bacilar (fezes diarreicas com sangue e muco), são bacilos Gram-negativos delgados, com característica cocobacilar em culturas jovens, sendo que apresentam um melhor crescimento em condições aeróbias, mas são anaeróbicos facultativos e enteroinvasivos (BROOKS et al., 2012; PHALIPON e SANSONETTI, 2007). São bactérias não móveis, produz ácido, mas não gás, e em geral não fermentam lactose, enquanto fermentam outros carboidratos (NIYOGI, 2005).

Desde a sua descoberta em 1986 pelo Dr. Kiyoshi Shiga, a *Shigella* vem sendo estudada, atualmente o gênero é subdividido em quatro espécies, sendo essas caracterizadas como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* (NIYOGI, 2005), sendo separadas pela identificação sorológica, através da utilização de antissoros polivalentes, onde vários sorotipos são responsáveis pela infecção (**Tabela 01**) (PHALIPON e SANSONETTI, 2007; LEVINE et al., 2007). Sua estrutura antigênica é complexa e sua especificidade sorológica depende dos polissacarídeos, especificamente os antígenos O somáticos das *Shigellas* (ZUO et al., 2013; BROOKS et al., 2012).

Tabela 01
Relação dos grupos sorológicos com as espécies bacterianas e com os sorotipos

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana	Sorotipos
Grupo A	<i>Shigella dysenteriae</i>	15 sorotipos
Grupo B	<i>Shigella flexneri</i>	14 sorotipos
Grupo C	<i>Shigella boydii</i>	20 sorotipos
Grupo D	<i>Shigella sonnei</i>	01 sorotipo

Fonte: Adaptado de LEVINE et al., 2007.

A variação ocorre justamente na porção do Lipopolissacarídeo (LPS), que é constituído por três regiões, sendo elas, subunidades repetidas do antígeno O, um núcleo interno e o lipídeo A. Nessa bactéria as subunidades repetidas do antígeno O, são a triraminose (Rha), *N*-acetil-glicosamina (*N*-ag) e O-glicose, essa estrutura tende a se modificar dependendo da ação de glicose e/ou acetato, um fator importante ocorre nas subunidades repetidas do antígeno O, chamado de glicosilação, essa ação promove alterações na composição do LPS, possibilitando uma característica de proteção a bactéria contra o hospedeiro e propiciando a exibição do aparelho de invasão, o T3SS (**Figura 01**) (MARTEYN et al., 2012; WEST et al., 2005).

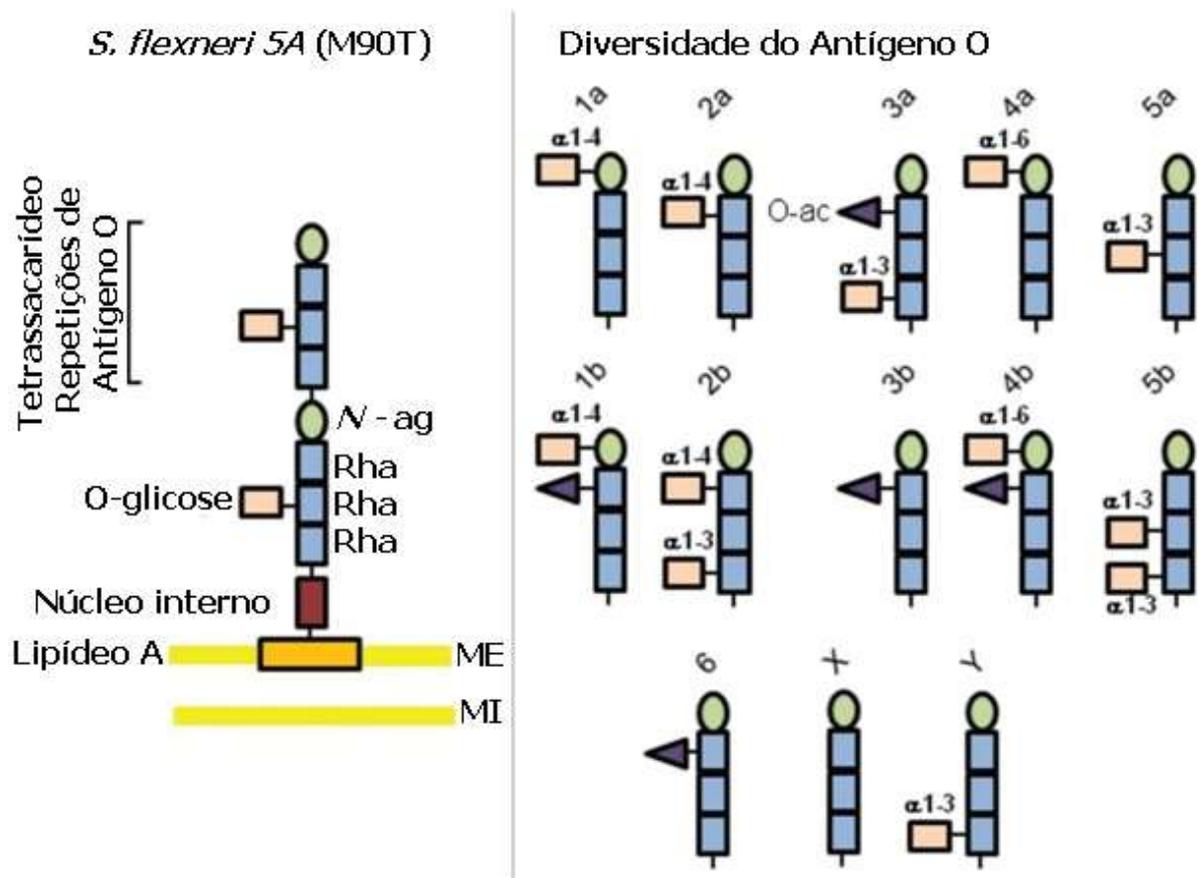


Figura 01 Modelo do LPS da *Shigella flexneri* 5A (M90T) e a diversidade do antígeno O.
Fonte: Adaptado de MARTEYN et al., 2012.

Esses organismos que tem a capacidade de invasão, geralmente são encontrados nas fezes, são sensíveis ao calor e não sobrevivem ao processo de altas

temperaturas, como em casos de preparo dos alimentos, entretanto são bactérias que possuem a habilidade de tolerar ambientes com baixo potencial hidrogeniônico (pH), no caso o estômago, onde os mesmos atingem e ultrapassam essa barreira (FDA, 2012).

A característica de sobrevivência no ambiente estomacal permite que a bactéria alcance o tecido intestinal, onde que por seguinte leva à diarreia, que é definida como a passagem de três ou mais fezes moles ou líquidas por dia e no caso pode ser avaliada como a passagem mais frequente do que é normal para o indivíduo (WHO, 2013). Contudo, quando a diarreia tem a presença de sangue, recebe-se o nome de disenteria, onde pode haver também presença de muco e pus, sugerindo dessa forma inflamação ou infecção do intestino (BRASIL, 2014).

A shigelose é uma doença infecciosa, a pessoa infectada geralmente desenvolve um quadro de diarreia com sangue e muco, cólicas abdominais e tenesmo, a infecção é provocada por um número extremamente pequeno de bactérias (10 - 100 organismos) nos seres humanos (CDC, 2013; RAM, 2008; SHIM, 2007).

2.1.1. Epidemiologia

As doenças diarreicas são a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade, sendo que a cada ano a diarreia mata aproximadamente 760 000 dessas crianças. Os casos dessa doença já chegam a números desastrosos, onde são identificados cerca de 1,7 bilhões em todo o mundo (WHO, 2013).

Cerca de 165 milhões dos casos de diarreia que ocorrem anualmente relacionados à *Shigella spp.* 99% ocorrem em países em desenvolvimento e deste total, 69% ocorrem em crianças menores de 5 anos de idade, além disso 60% das mortes ocorrem nessa faixa etária (KOPPOLU et al., 2013; NIYOGI, 2005). A persistência desse quadro diarreico e a recorrência do mesmo são consideradas as

principais causas de morbidade e mortalidade no mundo entre essas crianças (ORLANDI et al., 2006).

Ram et al. (2008) elaborou um levantamento sobre a epidemiologia (incidência) da *Shigella*, na revisão realizada foi abordado dados de países com baixo desenvolvimento a países de médio desenvolvimento entre o período de 1984 a 2005 (**Figura 02**).

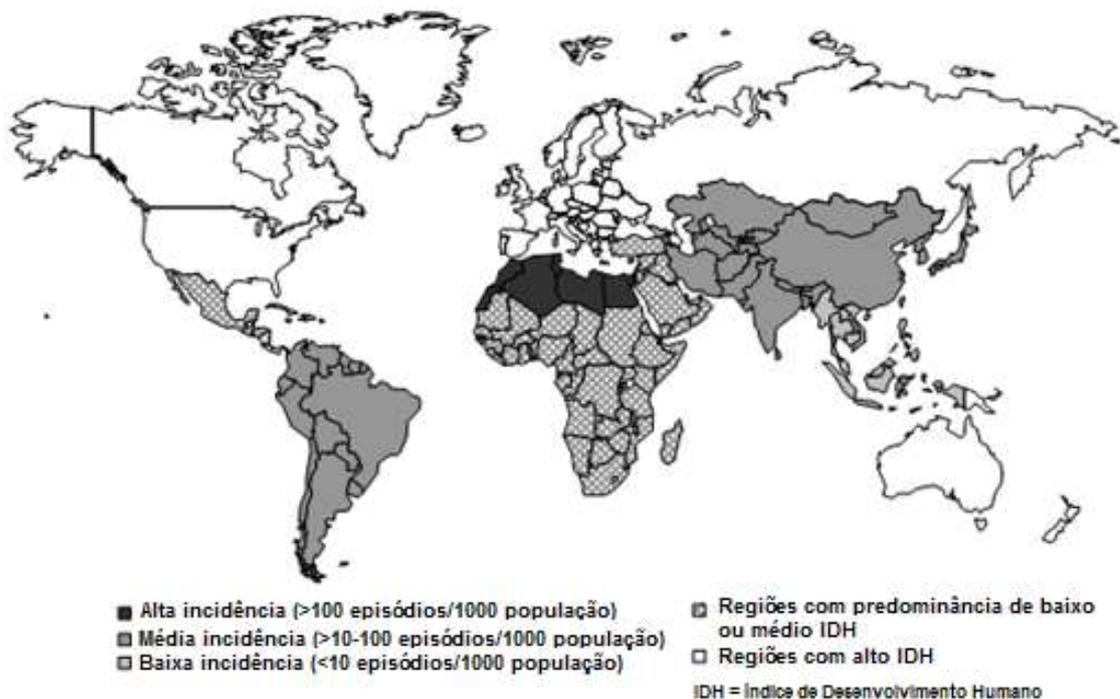


Figura 02: Incidência de shigelose por região geográfica, 1984-2005. Países que contribuíram com os dados de incidência: China, Tailândia, Egito, Bangladesh e Brasil.

Fonte: Adaptado de Ram et al., 2008.

A *Shigella flexneri* e a *Shigella sonnei* são responsáveis pela forma endêmica da doença, a *S. flexneri* predomina em países em desenvolvimento, enquanto a *S. sonnei* é mais frequentemente isolada em países desenvolvidos, mas em geral a *Shigella sonnei* e a *Shigella boydii* tendem a causar a doença de uma forma mais branda do que a *Shigella flexneri* e a *Shigella dysenteriae* (FDA, 2012; RAM, 2008; PHALIPON e SANSONETTI, 2007).

Nos Estados Unidos a bactéria do gênero *Shigella* causa cerca de 500 000 casos de diarreia a cada ano (HEIMAN, 2014), na África a infecção causada por essa bactéria representa 8,5% de todas as mortes no país. Em Madagascar somente 50% da população têm a oportunidade de utilizar fontes de água tratadas e menos de 20% têm acesso a instalações sanitárias melhoradas, devido a isso, 50% das crianças menores de 5 anos é diagnosticada com um microrganismo patogênico e aproximadamente 10% dessas crianças morrem por conta da disenteria associada ao patógeno (BUBLITZ, 2014).

Vários estudos têm sido realizados no Brasil. Na região Norte, destaca-se um estudo realizado por Orlandi et al. (2001) em Porto Velho no Estado de Rondônia, onde foi demonstrado que dos 130 casos de diarreia, 10 casos (7,7%) estiveram relacionados com a *Shigella spp.*, sendo que 8 casos foram com a *Shigella flexneri* e 2 casos foram com a *Shigella sonnei*. Dos sintomas, 8 dessas crianças apresentaram muco e sangue nas fezes, 2 tiveram febre e 9 exibiram quadro de vômito. A **Tabela 02** mostra a distribuição etária dos casos de diarreia.

Tabela 02
Distribuição etária dos casos de diarreia

Faixa etária (meses)	Casos de diarreia	
	N	%
0 a 6	28	21,53%
7 a 12	34	26,15%
13 a 24	43	33,07%
25 a 36	10	7,70%
37 a 48	10	7,70%
49 a 60	5	3,85%
Total	130	100%

Fonte: Adaptado de Orlandi et al., 2001

No Estado do Pará, um isolamento de 50 amostras de *Shigella* no período de 1990 a 2000, em pacientes com idades que variaram de 0 a 81 anos, resultou na identificação de 32 (64%) isolados de *Shigella flexneri* e 18 (36%) de *Shigella sonnei* (BASTOS e LOUREIRO, 2010). No estudo realizado no Instituto Evandro Chagas, no

Estado do Pará, no período de 1979 a 2009, em pacientes com idades que variaram de 0 a 5 anos, foram isoladas 122 bactérias do gênero da *Shigella*, onde foram identificados como *Shigella flexneri* (66,4%) e *Shigella sonnei* (32,8%) (BASTOS et al., 2012).

Na região sul do Brasil, precisamente no Rio Grande do Sul um grupo de pesquisadores isolou no período entre 2003 e 2007 um total de 152 cepas de *Shigella* a partir de alimentos e de amostras fecais de pacientes com shigelose (PAULA et al., 2010).

Com a identificação das 152 cepas, foi possível observar que 71,1% correspondiam a *S. flexneri*, 21,5% a *S. sonnei*, 0,7% a *S. dysenteriae* e 6,7% (10 cepas) foram identificadas somente como *Shigella spp.* Demonstraram com a caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos que grande parte das cepas foi resistente à estreptomicina (88,6%), seguido de ampicilina (84,6%) e trimetoprim/sulfametoxasole (80,5%) (PAULA et al., 2010).

Já no sudeste do Brasil, em Minas Gerais, foram cultivadas as fezes de 157 crianças, onde somente 10,8% do total dessas fezes tiveram a bactéria recuperada, sendo que 88,2% desse recuperado bacteriano foi identificado como *S. sonnei* (SOUSA et al., 2013).

Esse estudo demonstrou que todos os isolados que foram positivos para *Shigella* confirmaram a presença de genes de virulência como ipaH, iuc e sen, assim como o locus ial. E quando foi realizado o teste para o gene set1A, a presença foi observada somente nas amostras de *S. flexneri* (11,8%) (SOUSA et al., 2013).

Quando realizado os testes de antibiograma para observar as taxas de resistência das cepas de *Shigella*, observaram que 4 cepas (23,5%) eram resistentes à ampicilina e 14 cepas (82,4%) eram resistentes à trimetoprim/sulfametoxasole (SOUSA et al., 2013).

2.1.2. Fatores de Risco, Prevenção e Controle

A falta de acesso à água potável e às instalações sanitárias adequadas leva a população em países menos desenvolvidos a despejar de forma inadequada as fezes (KARAMBU et al., 2014), a falta de higiene doméstica (não lavar as mãos antes da ingestão de alimentos) é fortemente associada à infecção por *Shigella* (TANG et al., 2014; MAÏNASSARA, 2014).

Estima-se que aproximadamente 25% das pessoas defecam ao ar livre nos países em desenvolvimento, sendo que em algumas cidades da África a utilização de latrinas (lugar reservado para dejeções, privada) é proibida para crianças menores de 5 anos pelas próprias mães (KARAMBU et al., 2014; LINDSAY et al., 2012). Em um estudo realizado por Al-Mazrou et al. (1995) demonstrou que a taxa de diarreia em crianças que usaram campos abertos para a defecação foi maior (13,5%) do que nas crianças que usaram banheiros tipo *flush* (7,4%) ou tipo latrina (8,7%).

De modo que uma pessoa infectada pode não apresentar todos os sintomas, mas ainda assim pode passar a infecção para outra pessoa, já que sua rota de transmissão é pela via efetiva fecal-oral, por água e alimentos contaminados ou pessoa a pessoa (CDC, 2013; NIYOGI, 2005).

As medidas para prevenir a diarreia incluem o acesso seguro à água potável, fervida ou clorada, o uso de saneamento melhorado, higienização dos alimentos, o cozimento adequado dos alimentos, lavar as mãos com água e sabão antes e depois de ir ao banheiro, além do aleitamento materno exclusivo durante os primeiros seis meses de vida (WHO, 2013; BRASIL, 2005).

2.1.3 Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Tratamento

A shigelose não pode ser distinguida de forma confiável somente por características clínicas e na microscopia, nem ao menos por meio da rotina de fezes frescas por contagem de polimorfonucleares (PMN), apesar de ser um método barato, rápido e fácil de ser realizado. Outras bactérias podem apresentar características semelhantes à da *Shigella spp.* na parte clínica e microscópica (SOUSA et al., 2013; WHO, 2005), ainda assim, a anamnese é importante quando se visa averiguar a idade do paciente, a duração do episódio atual da diarreia e características das fezes e queixa de dores abdominais (BRASIL, 2014).

Para a detecção dos agentes patogênicos bacterianos, as fezes são colocadas em meio Cary-Blair para a conservação do material, assim são cultivadas em placas com meio seletivo, onde posteriormente as colônias são selecionadas para a realização dos testes bioquímicos, soro aglutinação e reação em cadeia da polimerase (PCR).

Dessa forma a conduta do tratamento é direcionada à realização do antibiograma para observar qual antibiótico tem a amplitude necessária contra a cepa bacteriana analisada (HIEN et al., 2007; TRANG et al., 2007).

Contudo um estudo realizado por Marcoleta et al. (2013) na região metropolitana do Chile, levantou o percentual de resistência aos antibióticos, dados esses que foram analisados a partir de bactérias da espécie *Shigella sonnei*, observando que houve uma queda na resistência aos antimicrobianos de 1997 à 2007, mas que à partir de 2008 houve um aumento significativo da resistência dessa bactéria aos antibióticos, levando a 100% de resistências com os antimicrobianos utilizados, exceto com ciprofloxacina e ácido nalidíxico (**Figura 03**).

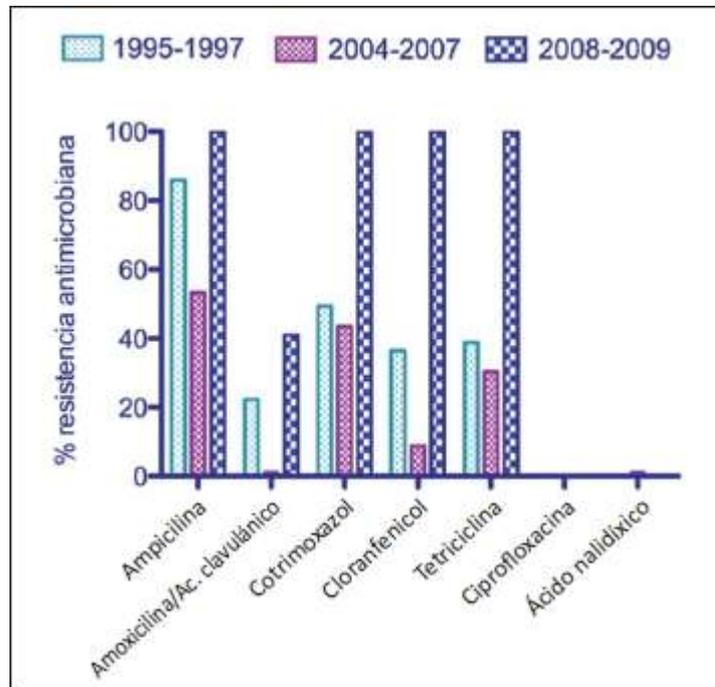


Figura 03: Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Shigella sonnei* isoladas na região metropolitana do Chile.

Fonte: Adaptado de Marcoleta et. a., 2013.

A shigelose é a principal causa de disenteria em crianças, sendo que a *Shigella flexneri* é o patógeno mais predominante, dessa forma a terapia antimicrobiana ainda é um instrumento valioso no controle dessa doença, devido a sua ação de diminuir a duração, a intensidade da doença, prevenindo complicações e casos mais letais (APPANNANAVAR et al., 2014; MARCOLETA et al., 2013; MANDAL et al., 2013).

Porém, em casos onde a diarreia atinge a forma mais grave, são observadas perdas significativas de alguns nutrientes, sendo assim as principais condutas para o tratamento são a reidratação com ORS (sais de reidratação oral), composto por água potável, sal e açúcar, de forma que é absorvida no intestino delgado e substitui a água e os eletrólitos perdidos nas fezes, como também é recomendada a administração de suplementos de zinco, com o intuito de diminuir em 25% a duração do episódio diarreico e em 30% o volume das fezes (WHO, 2013).

Apesar disso, uma vacina eficaz para prevenir a doença causada pela *Shigella* ainda não foi desenvolvida e aplicada ostensivamente. De certo modo, o grande impedimento se dá pelo fato de que é necessário criar uma estratégia que confira uma maior proteção contra os diversos sorotipos relevantes relacionados aos surtos dos casos da doença (LIVIO et al., 2014; LEVINE et al., 2007).

2.2 Mecanismos de Invasão

Estudos realizados por Giannella et al. (1972) mostrou que pacientes com ausência ou diminuição de ácido clorídrico no estômago eram mais susceptíveis a infecções por microrganismos, comparado a aqueles com o nível normal de acidez do estômago.

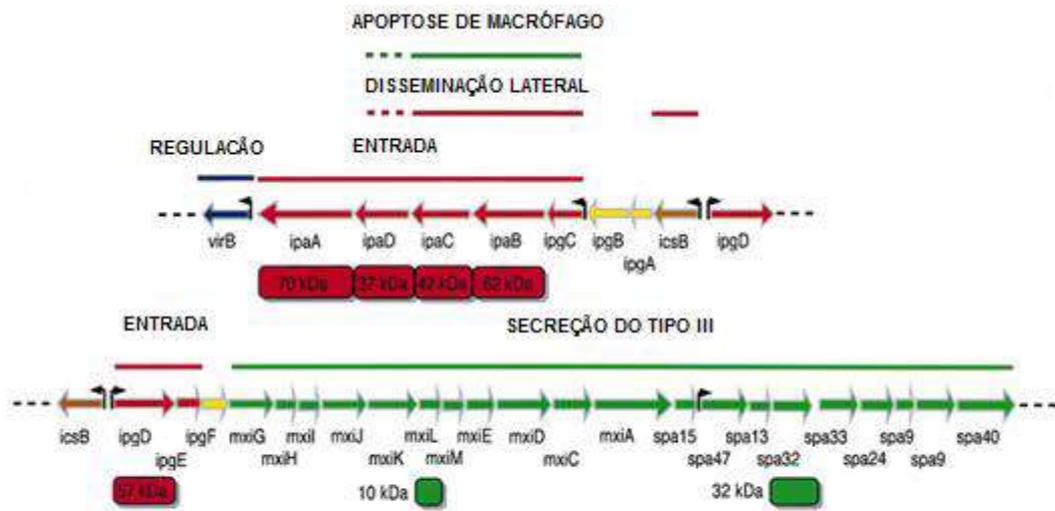
Embora isso tenha sido observado anteriormente, experimentos de Gorden & Small (1993) demonstraram que espécies de *Shigella* e *Escherichia coli* (*E. coli*) eram capazes de sobreviver ao pH de 2,5 por um período de 2 horas, dessa forma a infecção ocorria independente da acidez do estômago, pela resistência de algumas bactérias a esse fator.

Em virtude dessa característica de sobreviver ao ácido estomacal, a bactéria atinge o cólon, por apresentar tropismo a esse tecido, ocasionando a invasão na camada da mucosa. As cepas de *Shigella* penetram e replicam-se dentro das células epiteliais da mucosa na lâmina basal, região susceptível da mucosa gastrintestinal, onde a invasão ocorre de forma basolateral (XU et al., 2009; CHAMEKH et al., 2008; JENNISON e VERMA, 2004).

O tropismo pelo intestino humano é importante para a transcrição dos genes de virulência, demonstrando a necessidade de um ambiente onde os sinais osmóticos, térmicos e de pH são propícios à bactéria (MARTEYN et al., 2012; KANE e DORMAN, 2012; CHAMEKH et al., 2008).

2.3 Fatores de Virulência da *Shigella spp.*

Muitos estudos revelam que o processo de patogênese da *Shigella* é mediado por genes cromossômicos e plasmidiais. No cromossomo podem ser encontrados genes que regulam a expressão dos genes de virulência plasmidiais, que são genes importantíssimos para a sobrevivência da bactéria no trato intestinal. Esse genoma bacteriano apresenta sequências denominadas ilhas genômicas, sendo que, as regiões que carregam genes que codificam para um ou mais fatores de virulência, são chamados de PAIs ou ilhas de patogenicidade (**Figura 04**) (NIYOGI, 2005; SANSONETTI, 2001; HACKER e KAPER, 2000).



SHIGELLA FLEXNERI (30KB) "ILHA DE PATOGENICIDADE" NO PLASMÍDEO DE VIRULÊNCIA

Figura 04: Mapa da ilha de patogenicidade de 30kb do plasmídeo.

Fonte: Sansonetti, 2001.

Além dos genes do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), algumas cepas de *Shigella* apresentam um gene que codifica a enterotoxina de *Shigella* 1 e 2 (shET1 e shTE2), que estão relacionadas com a secreção de fluidos para o intestino, representando a fase aquosa da diarreia. Vale a pena frisar que apenas uma espécie dessa bactéria, a *Shigella dysenteriae* sorotipo 1, que detêm a toxina de Shiga (*stx*), atinge uma maior parte de células e que é responsável pelo desenvolvimento das lesões vasculares no cólon, no rim e no sistema nervoso central, dessa forma as infecções causadas por essa espécie e sorotipo estão diretamente associadas a forma letal da doença (SCHROEDER E HILBI, 2008).

Apesar das toxinas de *Shigella* serem liberadas na lise celular, elas não são associadas com o processo de invasão (VARGAS et al., 1999), sendo principalmente relatadas na secreção de fluidos intestinais, causando a diarreia aquosa severa da shigelose (NIYOGI et al., 2004). A enterotoxina 1 de *Shigella* (shET1) foi descrita pela primeira vez em *Shigella flexneri* 2a, contendo duas subunidades (A e B) que são codificadas pelo gene *set1* (NORIEGA et al., 1995) separados por apenas 3pb (FASANO et al., 1997). A enterotoxina 2 de *Shigella* (shET2), primeiramente descrita em EIEC, é codificada pelo gene *sen* e está localizada em um plasmídeo de 140MDa associado com invasão (VARGAS et al., 1999; NATARO et al., 1995).

Tabela 03
Relação dos genes da *Shigella* e suas funções.

Gene	Função
mxi-spa	invasão e internalização
ipaA	despolarização de actina
ipaB	indução da apoptose
ipaC	polimerização da actina
ipaD	formação do complexo com ipaB
ipgD	desorganização da membrana
virA	desestabilização de microtúbulos
ipaH	espace do macrófago
sepA	invasão tecidual
virF	transcrição de virB e icsA
virK	regulação pós-transcricional de icsA
virB	ativação dos ipas, mxi-spa operon
icsA/virG	nucleação de filamentos de actina

Fonte: Adaptado Da Cruz et al., 2014; Schroeder e Hilbi, 2008; Sansonetti, 2001; Hacker e Kaper, 2000.

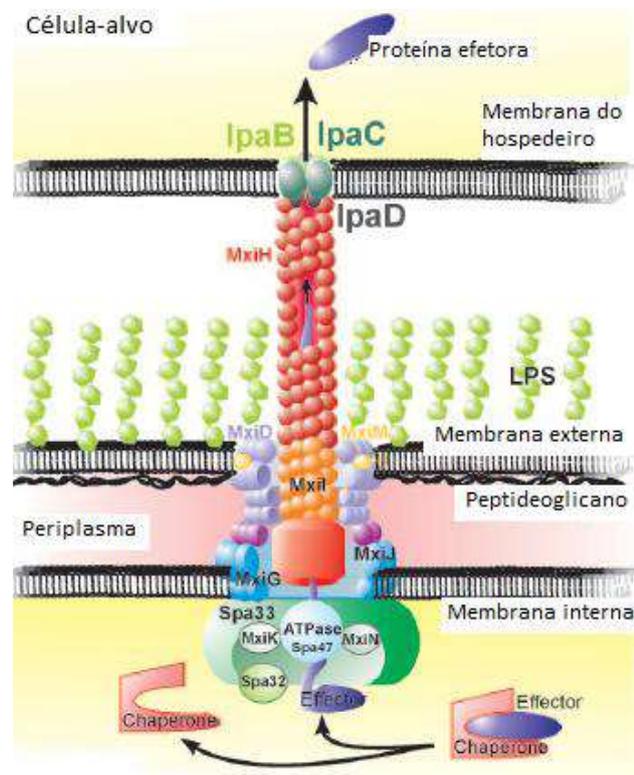


Figura 06: Arquitetura do T3SS Mxi-Spa de *S. flexneri*. A agulha se destaca do corpo basal para a superfície bacteriana.

Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.

Todos esses genes participam da invasão, escape e disseminação intracelular e intercelular no trato intestinal, portanto após a bactéria ter sobrevivido ao ambiente ácido do estômago, elas conseguem atravessar as células M (células epiteliais membranosas), ao passar por essa barreira, a *Shigella* enfrenta os macrófagos residentes que tem a função de englobar e destruir todo o material que entra, mas que, por sua vez, é induzida a morte por apoptose (liberando as citocinas IL-1 β e IL-8). Dessa forma a *Shigella* consegue se livrar do macrófago partindo para uma invasão na superfície basal das células epiteliais, que é chamada de invasão basolateral, tendo como passo importante a ligação às células hospedeiras por uma interação entre o complexo de ipaBC e integrinas, onde posteriormente escapa do fagossomo e se multiplica no citoplasma. É importante frisar que a *Shigella* não possui uma estrutura que lhe dê motilidade, mas sua movimentação ocorre através da polimerização de uma cauda de actina, dando a ela propulsão através da célula. E assim um ciclo se completa e outro se inicia, com novas invasões. Em virtude dessas invasões um mediador intracelular verifica a presença dos peptidoglicanos bacterianos e assim resulta no recrutamento de leucócitos PMN (polimorfonucleares) para o local da infecção. E assim com o objetivo de ajudar, os PMN destroem a integridade da camada epitelial, mas que por fim faz com que as bactérias agora entrem na camada submucosa sem a necessidade de passar pelas células M (**Figura 07**) (LEE et al., 2014; LUM e MORONA, 2014; SCHROEDER E HILBI, 2008; JENNISON E VERMA, 2004; SANSONETTI, 2001).

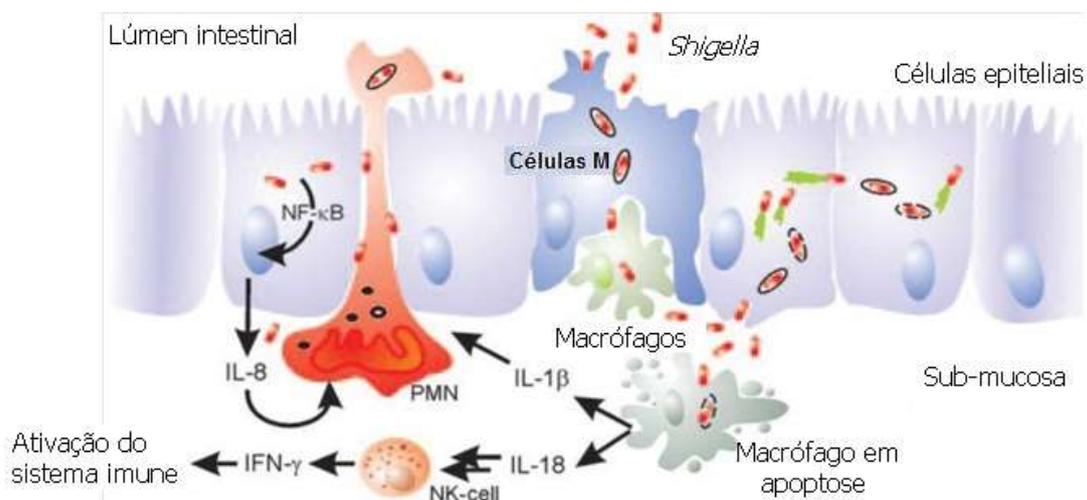


Figura 07: Entrada e disseminação da *Shigella* nas células epiteliais do intestino.
Fonte: Schroeder e Hilbi, 2008.

2.4. Invasão da *Shigella* em Células Fagocíticas e Não Fagocíticas

Muitos estudos sobre os mecanismos de patogênese vêm sendo realizados desde a descoberta da *Shigella*. Uma das metodologias mais utilizadas é a invasão em cultura de célula, uma vez que permite investigar os fatores que propiciam esse processo de sobrevivência, disseminação e sintomatologia causada pela bactéria em um ambiente controlado (CRUZ et al., 2014).

Em um estudo realizado por Mounier et al. (1992), observou que as células HeLa e Henle não se aproximaram das células epiteliais intestinais por não apresentarem confluência necessária na monocamada durante o processo de invasão e dessa forma, para estudar o processo de entrada da *S. flexneri* em um sistema de análise de células que refletiam melhor uma situação *in vivo*, foi utilizada a célula Caco-2, que apresentou um revestimento epitelial confluyente.

A *S. flexneri* expressa uma capacidade limitada para interromper as junções celulares, sendo então pouco invasiva nesse sistema de ensaio celular. Mas após testar com períodos de 1, 2, 4 horas, observou-se a presença de bactérias ao longo das junções intercelulares, mas não havendo ligação das bactérias a microvilosidades do enterócito, e dessa forma não havendo penetração na parte apical da célula, já na porção basolateral das células foi possível visualizar um grau limitado de invasão após 1 hora e de uma forma mais significativa após 2 horas de incubação (MOUNIER et al., 1992).

Nonaka et al. (2003) utilizou células fagocíticas, sendo elas a U937 e a J774, induzindo o contato com cepas de *Shigella flexneri* YSH6000, observando que as células infectadas perderam rapidamente a integridade da membrana, característica essa de necrose.

Neste estudo observaram que mesmo uma cepa não virulenta, morta com gentamicina, foi capaz de induzir a apoptose em células U937, então constatou que a apoptose não está relacionada com a patogenicidade da *Shigella* e não requer internalização bacteriana. Onde a necrose ocorreu pela formação de poros na membrana da célula hospedeira. Sugerindo que a morte celular rápida depende da

virulência da *S. flexneri* e da expressão dos genes ipaBCD e outras proteínas (NONAKA et al., 2003)

Em células HEp-2, um grupo de pesquisadores conseguiu demonstrar que a enterotoxina *sigA* que reside na PAI de *S. flexneri* possui um efeito citopático, onde se desempenha um papel na acumulação de fluído intestinal associado à infecção pela *S. flexneri* (AL-HASANI et al., 2000).

Recentemente esse mesmo grupo de pesquisadores, demonstrou que a *sigA* se liga especificamente nas células HEp-2 e degrada a espectrina α II humana recombinante (α -fodrina), onde é observado que os efeitos citotóxicos mediados por *sigA* está relacionado com a clivagem da fodrina intracelular *in situ*, portanto estes resultados implicam que essa enterotoxina altera o citoesqueleto durante a patogênese da shigelose (AL-HASANI et al., 2009).

Já este estudo utilizou cepas de *S. dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei* isoladas de crianças com diarreia em Brasília - DF, células HeLa e proteínas isoladas do leite (Lf- lactoferrina humana; fSC- componente secretor livre), sIgA (imunoglobulina A ligada a uma molécula de componente secretor) no processo de invasão, a fim de ser observar a interação dessas proteínas com a bactéria (WILLER et al., 2004).

Com isso, este estudo demonstrou que tanto a adesão quanto a invasão das espécies de *Shigella* foram inibidas pela baixa concentração de imunoglobulina A, lactoferrina humana e componente secretor livre. Sugerindo que o leite humano pode exercer um papel importante inibindo a adesão e a invasão da *Shigella*, evitando a shigelose em lactentes (crianças de até 24 meses de idade que são amamentadas) (WILLER et al., 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de grandes avanços já terem sido obtidos no saneamento básico no mundo, a *Shigella* continua sendo uma das maiores causas de morte entre crianças menores de 5 anos (YANG et al. 2014). Apesar disso, uma vacina para prevenção ou tratamento dessa doença que afeta milhões de crianças no mundo ainda não existe.

No Brasil, vários estudos ocorrem na região sul e sudeste (SOUSA et al., 2013; PAULA et al., 2010), porém na região Norte, estes estudos estão limitados aos Estados do Pará (BASTOS E LOUREIRO, 2010; BASTOS et al. 2012) e Rondônia (ORLANDI et al. 2001; SILVA et al., 2008). No Amazonas há carência de estudos epidemiológicos sobre os agentes causadores da diarreia.

Durante os anos de 2007 a 2009 nosso grupo de pesquisa realizou um grande estudo epidemiológico envolvendo a coleta de fezes de 1500 crianças com quadro diarreico severo, atendidas em Hospitais Públicos de Manaus - AM. Dentre os patógenos identificados, 36 isolados foram positivos para *Shigella*. Recentemente, a tipagem molecular dos genes de virulência destas amostras identificou os genes ipaBCD e ipaH como os fatores de virulência mais frequentemente encontrado e revelou uma associação da subunidade da proteína shET-1B com desidratação e do gene ipaH com febre e presença de sangue nas fezes (CRUZ et al., 2014).

Esta relação da sintomatologia dos pacientes com a presença de determinados fatores de virulência encontrados neste estudo, nos levou a questionar se haveria variabilidade nos mecanismos de patogenicidade relativos à invasão em células fagocíticas e não fagocíticas, frente a estas cepas clínicas com diferentes perfis de virulência e quais genes estariam envolvidos durante este processo invasivo.

Esse conhecimento pode nos auxiliar a elucidar os mecanismos de ação de cepas clínicas frente a padrões bem caracterizados, identificando possíveis biomarcadores de infecção e caracterizando as cepas regionais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar os perfis de genes de virulência em isolados clínicos de *Shigella sp.* durante o processo invasivo.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de resistência a antibióticos dos isolados de *Shigella* de origem clínica;
- Identificar os perfis de genes de virulência destes isolados clínicos;
- Investigar a capacidade invasiva destes isolados em fagócitos e não fagócitos frente aos diferentes perfis de genes de virulência.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cepas Bacterianas e Condições de Crescimento

As amostras foram reativadas através da inoculação em 3mL de caldo LB (Luria-Bertani) por 24 horas a 37°C para o crescimento bacteriano, posteriormente foi realizado o plaqueamento nos meios de cultura Agar SS e Agar XLD e identificados pelos testes bioquímicos da galeria EPM, MILI e citrato de Simons.

Para o isolamento da bactéria foi realizado o plaqueamento com a alça de platina, transferindo-se a amostra do caldo LB para a placa, onde foi observado o crescimento bacteriano de forma distribuída no meio de cultura, possibilitando observar após a incubação por 24 horas a 37°C pelo menos uma colônia isolada.

Uma colônia com as características morfológicas relativas à *Shigella* foi escolhida e inoculada nos diferentes meios, onde permaneceu por mais 24 horas a 37°C, onde foi analisado os diferentes substratos, sendo eles o meio EPM (hidrólise de ureia, desaminação do triptofano, H₂S e produção de gás), meio MILI (descarboxilação de lisina, motilidade e prova de indol) e o meio citrato para detectar a sua utilização ou não pela bactéria.

5.1.1. Antibiógrama

As amostras foram inoculadas em caldo LB por 18 horas a 37°C para atingir uma concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, obtida por meio da medição da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro e diluições por regra de três simples. A inoculação ocorreu com auxílio de swab estéril em placas de Petri com meio Agar Muller-Hinton. Os discos de papel contendo os antibióticos foram dispostos nas placas e depois de 18 horas de incubação a 37°C foi possível visualizar a formação ou não dos halos de inibição para medição em milímetros (mm), sendo caracterizada conforme o diâmetro do halo como uma bactéria sensível, intermediária ou resistente aos antibióticos expostos. As cepas bacterianas foram colocadas em condições supracitadas com os seguintes antibióticos: Ácido Nalidíxico (NAL), Amicacina (AMI), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Clorafenicol (CLO), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TET) (**Figura 08**).

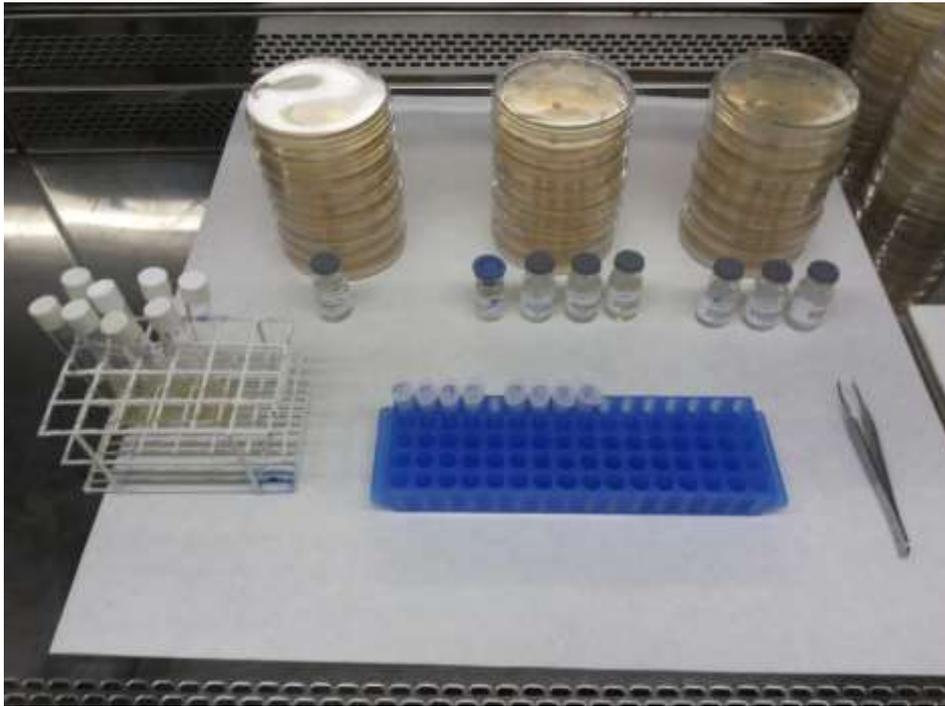


Figura 08: Amostras e materiais preparados para o teste de antibiograma, com a utilização de 8 cepas bacterianas (7 cepas selvagens e 1 cepa padrão) e 8 antibióticos.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. Modelo de Célula

A célula HEp-2 foi utilizada no teste de invasão qualitativo e quantitativo por ter apresentado capacidade de adesão, que por sua vez possibilitou o contato célula-bactéria para a invasão bacteriana, sendo essas, células originárias de carcinoma de laringe humana (WALTERS et al., 2012; CRAVIOTO et al., 1979).

5.2.1. Cultura Celular

5.2.1.1. Cultivo das células HEp-2

As células HEp-2 foram cultivadas em frascos de plástico de 25cm² de superfície de crescimento (*Corning*), contendo 6,5mL de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), onde foram acrescentados 10% Soro Fetal Bovino (*Cultilab*); DMEM - SFB 10%, e foram mantidos em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, de três a quatro dias.

Após este período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular foi lavada com 2,5mL de solução de tripsina a 0,25%. Em seguida, mais 2,5mL desta solução dispersante foram adicionados e deixados em contato com a monocamada celular por dois a quatro minutos, à temperatura ambiente. Depois de ter iniciado o desprendimento celular, todo o volume de tripsina foi retirado (evitando o seu efeito tóxico). Para as células se desprenderem por completo, o frasco foi agitado levemente de forma manual, e 5mL de DMEM - SFB 10% foram adicionados. Foram realizadas pipetagens vigorosas, com o devido cuidado, onde se evitou a formação de bolhas de ar, obtendo-se uma suspensão celular homogênea.

Posteriormente, foi realizada uma contagem do número de células viáveis dessa ressuspensão celular, onde foi utilizado o método de exclusão pelo corante Azul Tripán (SCHREK, 1936), quando finalmente foi feita uma diluição apropriada em MEM – SFB 10% (v/v), de modo que foi obtida uma concentração de 10^5 células por/mL.

5.2.1.2. Cultivo das células J774

As células J774 foram cultivadas em meio DMEM (suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-glutamina) a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. Aproximadamente 24 horas antes do teste de invasão, os macrófagos foram recolhidos, ressuspensos em meio DMEM recém preparado (PERDOMO et al., 1994).

5.3. Teste de Invasão

Os testes de invasão qualitativos e quantitativos foram realizados baseando-se na técnica descrita por Francis et al. (1991) com algumas modificações. Para a realização destes testes, as amostras foram testadas quanto à sensibilidade à gentamicina pelo teste de concentração inibitória mínima (MIC).

5.3.1. Preparo das Amostras Bacterianas

Para os testes de invasão qualitativos e quantitativos as amostras de *Shigella* foram colocadas para crescer em caldo LB por 18 horas a 37°C, após isso as amostras foram transferidas por uma alça de platina para um novo tubo com caldo

LB que serão incubadas por 7 horas a 37°C. A partir do último crescimento bacteriano as amostras foram medidas pelo espectrofotômetro e a partir dessa medição foram diluídas em solução salina 0,85% estéril, obtendo-se uma concentração de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ bactérias/mL.

5.3.1.1. Curva de Crescimento Bacteriano

Foi realizada com a finalidade de identificar o horário em que a bactéria estaria no período de crescimento (fase log), onde a reprodução da mesma se encontra extremamente ativa e com maior atividade metabólica, desempenhando seu papel durante o processo de invasão.

Dessa forma, após a primeira incubação conforme descrita no item 5.3.1 todas as amostras foram medidas no espectrofotômetro com densidade óptica de 600_{nm} (DO), obtendo-se uma concentração de $1,0 \times 10^8$ bactérias/mL, depois foi adicionado 1mL desse crescido bacteriano em um erlenmeyer contendo 50mL de caldo LB, de modo que foram incubados em estufa a 37°C com agitação, onde a medição no espectrofotômetro ocorreu de hora em hora até o período onde foi identificado a fase de declínio da bactéria (fase de morte), com quedas consecutivas de concentração celular (**Figura 09**).

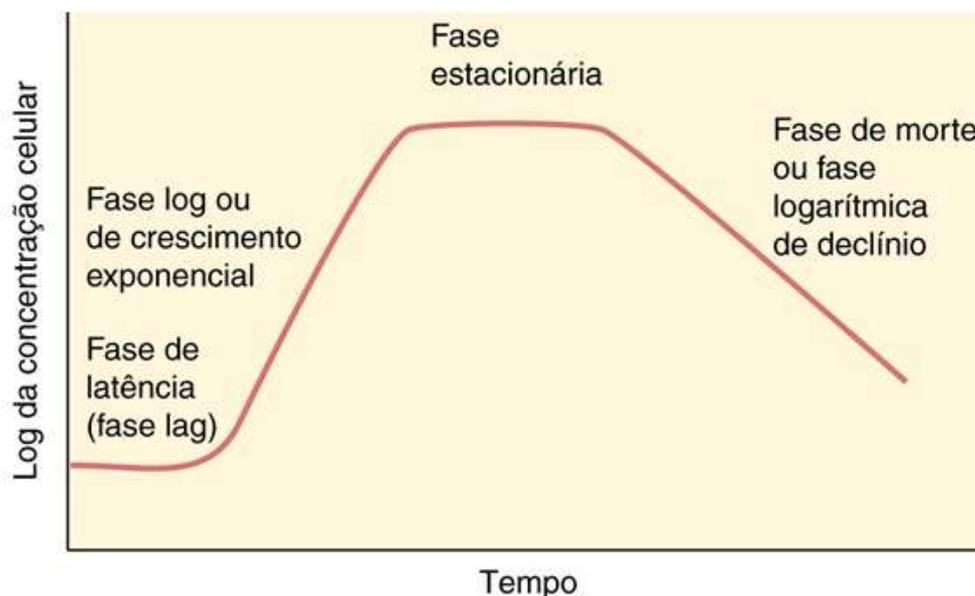


Figura 09: Curva de crescimento bacteriano.

Fonte: Adaptado de Brooks et al., 2012.

5.3.2. Teste de Invasão Qualitativo

Para a realização do teste de invasão qualitativo as células foram cultivadas conforme item 5.2.1 e em seguida as células foram distribuídas em cada uma das lamínulas colocadas em cada poço das placas de cultura de células de 24 poços. Após esse procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, sob a atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

Após o período de incubação de 24 horas das placas, o meio de cultivo foi retirado e foi adicionado em cada poço 1mL de DMEM-SFB 10% e depois foi adicionado 100µL das culturas bacterianas (concentração de 3,0 x 10⁸ bactérias/mL) e foram colocadas em uma estufa a 37°C, com 5% de CO₂ para células HEp-2 por 1 e 3 horas e para células J774 por 30 e 60 minutos, propiciando o contato da bactéria com a célula. Em seguida a solução foi retirada e as células foram lavadas 4 vezes com PBS (Phosphate Buffered Saline). Posteriormente, foi adicionado aos poços 1mL de meio DMEM-SFB 10% com 100µg/mL de uma solução de gentamicina, e foi incubado por mais 1 hora em uma estufa a 37°C, com 5% de CO₂ para eliminar as bactérias extracelulares. Após a realização da última incubação o meio de cultivo foi desprezado, onde as células foram lavadas por mais 4 vezes com PBS.

A fixação das células ocorreu com a utilização da solução de Bouin (ácido pícrico 1,22%, formaldeído 40% e ácido acético glacial), onde foi adicionado 400µL em cada poço por 10 minutos, após esse período os poços foram lavados duas vezes com água Milli-Q (água ultrapura), em seguida as células foram coradas com as soluções 2 e 3 do Kit de coloração Panótico Rápido (Laborclin) por um minuto, sendo que foram realizadas 4 lavagens entre os corantes e depois do último corante.

Para o controle negativo, foi destinado um poço da placa de cultivo celular no qual, no lugar de 100µL da cultura bacteriana, foi acrescentado 100µL de solução salina 0,85% estéril.

Após todos os procedimentos supracitados no item 5.3.2, as lamínulas foram retiradas dos poços e coladas em lâminas com identificação de cada poço (7 cepas selvagens, 1 cepa padrão e 1 controle negativo). Depois de secas, foram observadas

em microscópio óptico com os aumentos de 400 e 1000 vezes a bactéria internalizada nas cepas de *Shigella* de origem clínica e a cepa padrão M90T.

5.3.3. Teste de Invasão Quantitativo

Após os procedimentos que foram realizados no item 5.3.2, o teste de invasão quantitativo prosseguiu com a contagem das células. Onde foram utilizados dois modelos celulares, a célula HEp-2 (1 e 3 horas) e a J774 (30 e 60 minutos) e 8 cepas bacterianas (M90T, 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27). Por conta disso, o método resultou-se em 32 variáveis, somando-se 16.000 células ao todo no experimento (500 células para cada variável).

5.4. Extração de DNA

O DNA genômico das 8 cepas (7 selvagens e 1 padrão) foram extraídos a partir de 3 mL de culturas que foram incubadas a 37°C durante 18 horas, sob agitação constante. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm (rotação por minuto) a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 300µL de tampão TEM (Tris 1M, EDTA, NaCl 3M). Foram adicionados 30µL de lisozima (20 mg/mL) e esta solução foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 50µL de Triton X-100 a 10% e 20µL de NaCl 3M, onde a suspensão foi aquecida a 60°C em banho-seco, por 5 minutos. Logo em seguida, foi adicionado 1µL de RNase (10mg/mL) e foi levada a uma nova incubação por 15 minutos a 37°C em banho-seco. Após esse período, foram adicionados 41µL de SDS a 10% e depois de serem homogeneizados, foi adicionado 2,5µL de proteinase K (10mg/mL), e em seguida direcionados para uma nova incubação (37°C por 15 minutos). Nesta etapa, foram adicionados 450µL de fenol e a suspensão foi agitada manualmente durante 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A fase aquosa então foi recuperada e adicionado 450µL de clorofórmio, onde depois foi agitada manualmente durante 5 minutos novamente. A solução foi novamente

centrifugada (12.000 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos), a fase aquosa foi novamente recuperada e após esse procedimento foi adicionado 41µL de NaCl 3M. Depois delicadamente foi adicionado 1µL de etanol 100% resfriado a -20 °C e novamente foi centrifugado (12.000 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos), e então o DNA foi recuperado e ressuspendido em 1mL de etanol 70% (resfriado -20°C). Após esses procedimentos, uma última centrifugação ocorreu, onde todo o sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspendido em um tampão TE (Tris-EDTA), onde foi estocado a -20 °C. A extração foi confirmada através da revelação em gel de agarose 8% a 100v.

5.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi realizada para identificar gênero/espécies e caracterizar o perfil de genes de virulência das cepas de *Shigella* que foram reativadas para o projeto, contendo 7 cepas clínicas e 1 cepa padrão (*Shigella flexneri* 5A M90T).

5.5.1. PCR de Gênero e Espécie de *Shigella*

Para a identificação do gênero foram utilizadas iniciadores específicos, para o gênero *Shigella*, o iniciador foi concebido a partir das regiões conservadas de invC. Para as espécies de *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* os iniciadores foram obtidos a partir das regiões não conservadas de rfc, wbgZ e rfpB. A identificação da *Shigella boydii* foi realizada pela amplificação do gene invC, do gene do gênero *Shigella* e pela ausência de todos os outros produtos de amplificação que são específicos para as outras espécies (**Tabela 04**) (OJHA et al., 2013).

Tabela 04
Relação dos genes alvos para caracterização de *Shigella sp.*

Gene alvo	Primer sequence (5'-3')	Localização do gene	Identidade do alvo	Número de acesso no GenBank
<i>invC</i>	TGC CCA GTT TCT TCA TAC GC GAA AGT AGC TCC CGA AAT GC	Plasmídeo	<i>Shigella genus</i>	AF386526
<i>rfc</i>	TTT ATG GCT TCT TTG TCG GC CTG CGT GAT CCG ACC ATG	Cromossomo	<i>Shigella flexneri</i>	CP000266
<i>wbgZ</i>	TCT GAA TAT GCC CTC TAC GCT GAC AGA GCC CGA AGA ACC G	Plasmídeo	<i>Shigella sonnei</i>	CP000039
<i>rfpB</i>	TCT CAA TAA TAG GGA ACA CAG C CAT AAA TCA CCA GCA AGG TT	Plasmídeo	<i>Shigella dysenteriae</i>	CP000640
<i>ompA</i>	GCA GGC ATT GCT GGG TAA ACA CTT GTA AGT TTT CAA CTA CG	Plasmídeo	Controle Interno	AY305875

Fonte: Adaptado de Ojha et al., 2013.

5.5.2. PCR de Genes de Virulência de *Shigella*

Foram utilizados 8 *primers* que estão relacionados ao gênero *Shigella* e 2 *primers* (*uidA* e *invE*) que estão associados à invasão e que também são encontrados em *E.coli* (**Tabela 05**) (CRUZ et al., 2014). Portanto, cada amostra foi submetida à amplificação por PCR com dez pares de *primers* diferentes, sendo que para a detecção desses genes de virulência, o DNA foi extraído das amostras utilizando o método de extração conforme descrito no item 5.4. A amplificação foi realizada em um termociclador pelos métodos que foram descritos por Aranda et al. (2004) e Faruque et al. (2002).

Tabela 05
Relação dos genes de virulência de *Shigella sp.*

Gene Alvo	Primers (5' - 3')	Tamanho (pb)
IpaA	FW: CAGATAGTTTGCTGTACGCT RV: TTCTCTGCCGAAGATGAAAC	2133
IpaB	FW: TCGGAAGAACTTTGAGTTTGTT RV: CAATCATACTTGGACGCAATTC	1883
IpaC	FW: GACTGAATGATGAGGTGGAA RV: CCAACTCTCAGGCTAATAGAAC	1272
IpaD	FW: ATGATGGTGAAGTTGCCTTAT RV: CAGTCAGATTGCTGGTAACAT	1149
IpaH1	FW: AGAAGACCGCTTTGCTTAC RV: TCTGAAACACCCTCCTCAT	2049
IpaH2	FW: GAACAGGGAAACGGATGA RV: GTTGCGACTTTACCTCTATTG	1925
IpaH3	FW: CTGCTGAAGGGAACCAATAA RV: CTGAACAGAGAAACGGATGAA	1902
IpaH4	FW: GCACAGGCGAGACATTTA RV: CTGAACAGAGAAACGGATGAA	1902
Ipah5	FW: TAGCACAGGCGAGACAT RV: GAACAGGGAAACGGATGAA	1986
IpaH6	FW: CTGAAACACCCTCCTCATT RV: CTGAACAGAGAAACGGATGA	2065
IpaH7	FW: AAGACCGCTTTGCTTACC RV: ATTGAGCCAGAACTTCACC	2065
IpaH1.4	FW: CGGAACTAACTGACCATCTC RV: GAAAGGGTACAAAGCAAACCTG	1880
IpaH2.5	FW: GGAAGCAATACCTGGAGAAA RV: GTCATATTCGCCCTGACTTT	1929
IpaH4.5	FW: GGTCACATTAACATGGGTAGAC RV: AGTCATCCTGTTTACCTCTTTC	1955
IpaH7.8	FW: TATCGGAAATGGTAAGTGAAA RV: GGTATTGAGCGAGGATTTAC	1878
IpaH9.8	FW: GTGCTGAAGTTCATTTATGG RV: CGTCACCAGGATATGCC	1890
set1A	FW: TCACGCTACCATCAAAGA RV: TATCCCCCTTTGGTGTA	309
set1B	FW: GTGAACCTGCTGCCGATATC RV: ATTAGTGGATAAAAATGACG	147
shET2.1	FW: ATGTGCCTGCTATTATTTAT RV: CATAATAATAAGCGGTCAGC	799
shET2.2	FW: CTACACCTTGTTGGAGTGAAC RV: CTCGCTATCTTATAGGAGCATT	513
ial	FW: CTGGATGGTATGGTGAGG RV: GGAGGCCAACAATTATTTCC	320
virF	FW: TCAGGCAATGAACTTTGAC RV: TGGGCTTGATATCCGATAAGTC	618
invE	FW: CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG RV: CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	766
uidA	FW: ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC RV: AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG	1487

Fonte: Adaptado de CRUZ et al., 2014; DANTAS, 2016.

6. RESULTADOS

6.1. Seleção e Identificação das Cepas Clínicas

As cepas clínicas de *Shigella* presentes neste estudo são provenientes de um estudo epidemiológico que foi conduzido nos anos de 2007 a 2009 no qual foram identificadas 30 cepas clínicas de *Shigella* associadas a diarreia infantil, coletadas nos hospitais públicos de Manaus (CRUZ et al., 2014). Deste total, foram selecionadas 7 cepas clínicas de *Shigella* para este estudo, baseadas em testes de invasão em célula HeLa realizada em estudos anteriores (dados não mostrados). As cepas selecionadas foram nomeadas como cepas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27.

Para a identificação de gênero/espécies foi realizado um PCR conforme descrito no item 5.5.1. O gênero *Shigella* foi confirmado para todas as cepas. As cepas 5, 7, 15 e 27 foram caracterizadas como *S. flexneri*, a cepa 17 como *S. sonnei* e as cepas 11 e 14 como *S. boydii* (**Figura 10**).

Amostras/ Genes	Filo	Gênero	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexnerii</i>	<i>S. boydii</i>
	<i>OmpA</i> 1319pb	<i>invC</i> 875pb	<i>rfpB</i> 211pb	<i>wbgZ</i> 430pb	<i>rfc</i> 537pb	---
<i>S. dysenteriae</i>	■	■	■			
<i>S. flexneri</i> 2a	■	■			■	
M90T - <i>S. flexneri</i> 5a	■	■			■	
<i>S. flexneri</i> 5	■	■			■	
<i>S. flexneri</i> 7	■	■			■	
<i>S. boydii</i> 11	■	■				■
<i>S. boydii</i> 14	■	■				■
<i>S. flexneri</i> 15	■	■			■	
<i>S. sonnei</i> 17	■	■		■		
<i>S. flexneri</i> 27	■	■			■	

Figura 10: Caracterização de gênero e espécies de *Shigella*, 7 cepas bacterianas e 5 genes (1 de gênero e 4 de espécies).

6.2. Caracterização do Perfil de Virulência das Cepas de *Shigella*

Todas as cepas clínicas de *Shigella* estudadas apresentaram os marcadores de *E.coli/Shigella InvE* e *UidA*. Os genes do SST3 IpaBCD foram positivos para todas as amostras, exceto a cepa de *S. flexneri* 5 que não amplificou para as subunidades IpaA e IpaB. Para os genes IpaH os resultados foram diversos: *S. flexneri* 5 não apresentou a subunidade 7.8; *S. boydii* 11, 14 e *S. flexneri* 17 não apresentaram a subunidade 2.5; e a *S. flexneri* 27 teve ausência da subunidade 6. Para as enterotoxinas shET as amostras 7, 15 e 27 tiveram a presença do conjunto completo (shET 1A, 1B, 2.1, 2.2). Os direcionadores de invasão ial e virF foram ausentes para as cepas 11 e 14 (**Figura 11**).

Cepas	Genes de virulência																						
	IpaA	IpaB	IpaC	IpaD	IpaH1	IpaH3	IpaH4	IpaH5	IpaH6	IpaH7	IpaH1.4	IpaH2.5	IpaH4.5	IpaH7.8	IpaH9.8	Shet1A	Shet1B	Shet2.1	Shet2.2	ial	Virf	InvE	UidA
<i>S. flexneri</i> M90T																							
<i>S. flexneri</i> 05																							
<i>S. flexneri</i> 07																							
<i>S. flexneri</i> 11																							
<i>S. flexneri</i> 14																							
<i>S. flexneri</i> 15																							
<i>S. flexneri</i> 17																							
<i>S. flexneri</i> 27																							

Figura 11: Caracterização de genes de virulência de *Shigella* sp.

6.3. Perfil de Resistência a Antibióticos

Todas as cepas bacterianas estudadas foram sensíveis aos antibióticos gentamicina, amicacina e ciprofloxacina. Foi observado que a tetraciclina demonstrou ser ineficaz, onde todas as cepas clínicas estudadas foram resistentes a este antibiótico. Contudo, todas as cepas foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado. A cepa 27 foi a resistente a mais antibióticos (n=5), seguida das cepas 15 (n=3) e 7 (n=2) (**Tabela 06**) (**Figuras 12-20**).

Tabela 06
Perfil de resistência aos antibióticos

		Antibióticos (halos de inibição - mm)															
		GEN		AMI		NAL		CIP		AMC		CLO		CRO		TET	
C e p a s	M90T	29	S	29	S	21	S	31	S	31	S	30	S	26	S	21	S
	5	24	S	23	S	23	S	31	S	22	S	25	S	29	S	0	R
	7	22	S	22	S	21	S	42	S	21	S	10	R	29	S	7	R
	11	23	S	23	S	23	S	32	S	25	S	28	S	31	S	0	R
	14	23	S	23	S	24	S	33	S	22	S	31	S	30	S	7	R
	15	24	S	24	S	23	S	41	S	17	I	12	R	31	S	7	R
	17	28	S	25	S	23	S	35	S	22	S	28	S	29	S	0	R
	27	27	S	24	S	*19	R	35	S	12	R	10	R	21	I	0	R

Legenda: S - Sensível; I - Intermediário; R - Resistente.

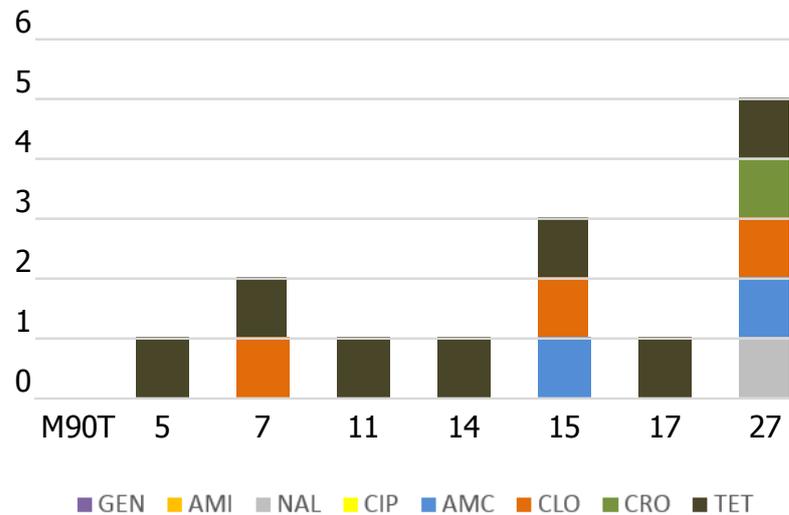


Figura 12: Perfil de resistência a antimicrobianos.



Figura 13: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 5.



Figura 14: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 7.



Figura 15: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 11.



Figura 16: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 14.



Figura 17: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 15.



Figura 18: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 17.



Figura 19: Perfil de resistência a antibióticos da cepa 27.



Figura 20: Perfil de resistência a antibióticos da cepa M90T.

6.4. Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada em triplicata para a determinação das fases de latência, crescimento exponencial, estacionária e de declínio. Nesse estudo, identificamos o horário de 7 horas como o melhor horário para indução da bactéria com a célula em estudo, por ser um período que não esteve próximo da fase de latência e nem da fase estacionária, onde se evitou uma baixa no metabolismo bacteriano.

Foi possível observar que a cepa padrão apresentou uma fase de latência (fase lag) muito curta, demonstrando que a bactéria se adaptou rapidamente ao meio novo, sendo que em 2 horas já tinha se iniciado a fase de crescimento (fase exponencial). Com o potencial para reprodução ativo, o crescimento bacteriano ocorreu até 11 horas após a inoculação ao meio novo. De forma que a partir de 11 horas a fase estacionária se iniciou permanecendo até 22 horas com uma concentração aproximada a $3,0 \times 10^8$ bactérias/mL. E então a fase de declínio (fase de morte) se deu início às 23 horas com quedas consecutivas até as 31 horas onde foi interrompida e dada por fim a curva de crescimento (**Figura 21**).

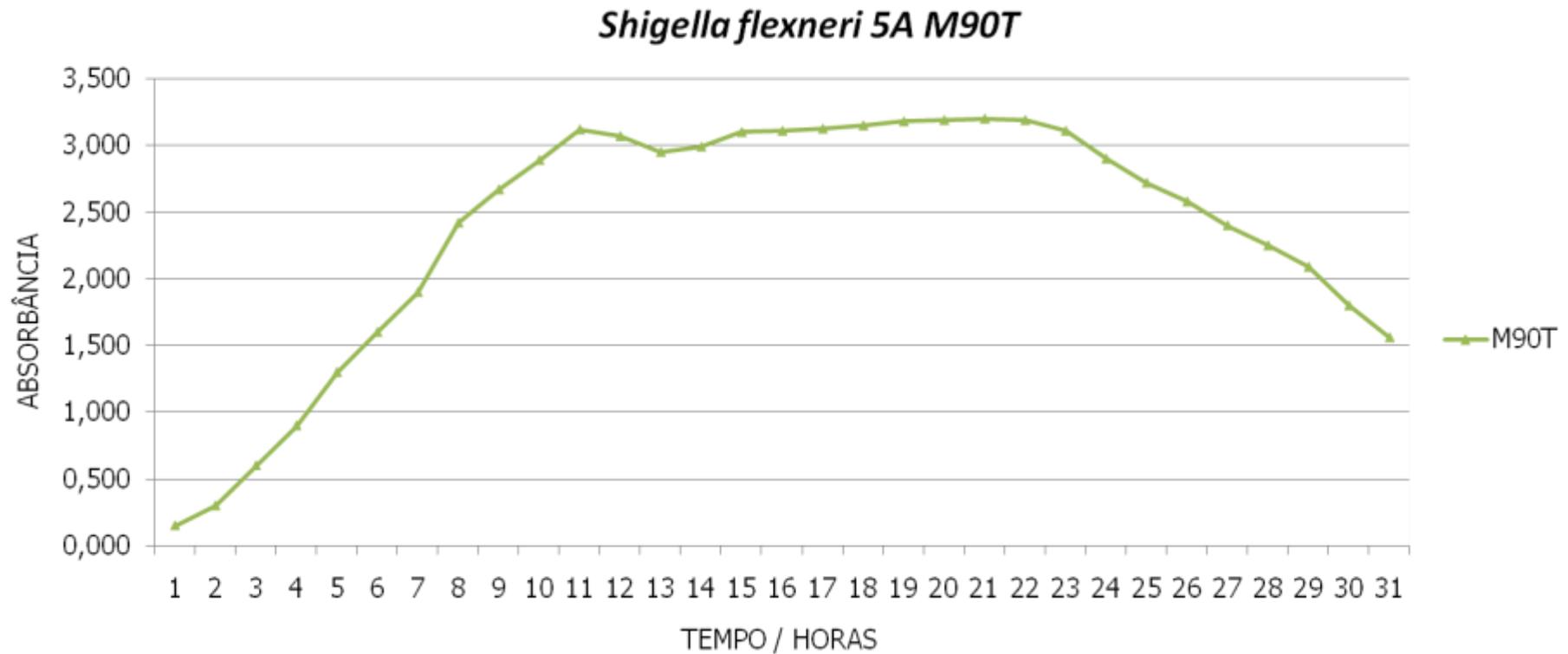


Figura 21: Curva de crescimento bacteriano com a cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T.

Figura 22: Invasão da cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T em célula HEp-2. **Figura 23:** Curva de crescimento bacteriano com a cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T.

6.5. Teste de Invasão Qualitativo e Quantitativo

6.5.1. Células HEp-2

Foi induzido o contato da cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T com a célula HEp-2 após o crescimento de 7 horas, conforme indicado pela curva de crescimento. Onde foi possível observar a capacidade de invasão dessa bactéria, através da visualização da mesma internalizada na célula em estudo (**Figura 22**).

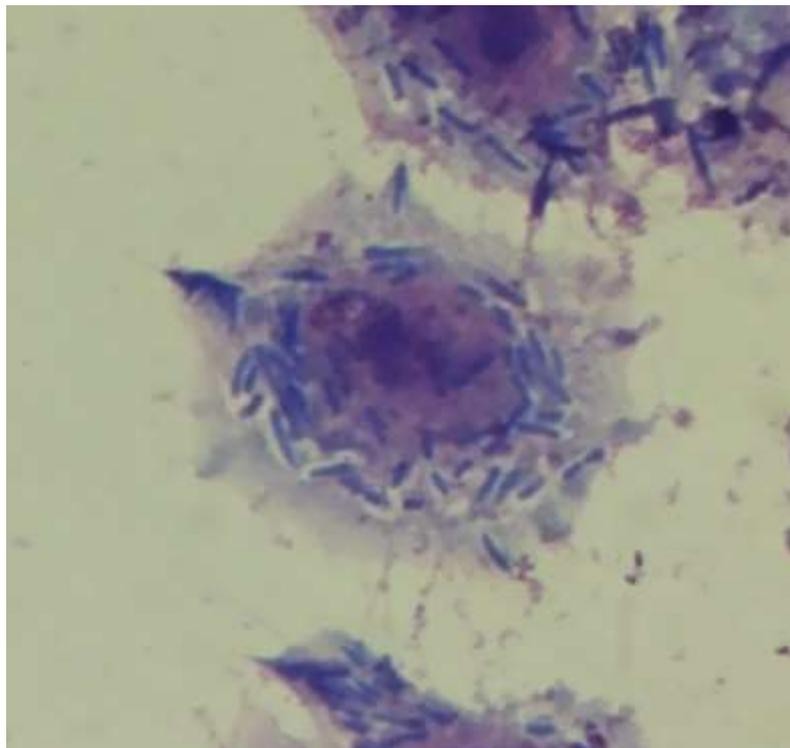


Figura 24: Invasão da cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T em célula HEp-2.

Figura 25: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa M90T em célula HEp-2. **Figura 26:** Invasão da cepa padrão *Shigella flexneri* 5A M90T em célula HEp-2.

No teste de invasão em células HEp-2, as cepas 7, 15, 17 e 27 apresentam invasão, enquanto as cepas 5, 11 e 14 foram negativas para este perfil (**Figuras 23-30**). Em 1h de exposição as cepas já iniciaram a invasão, porém o horário de 3h foi o horário com maior número de bactérias por células (**Figuras 31 e 32**).

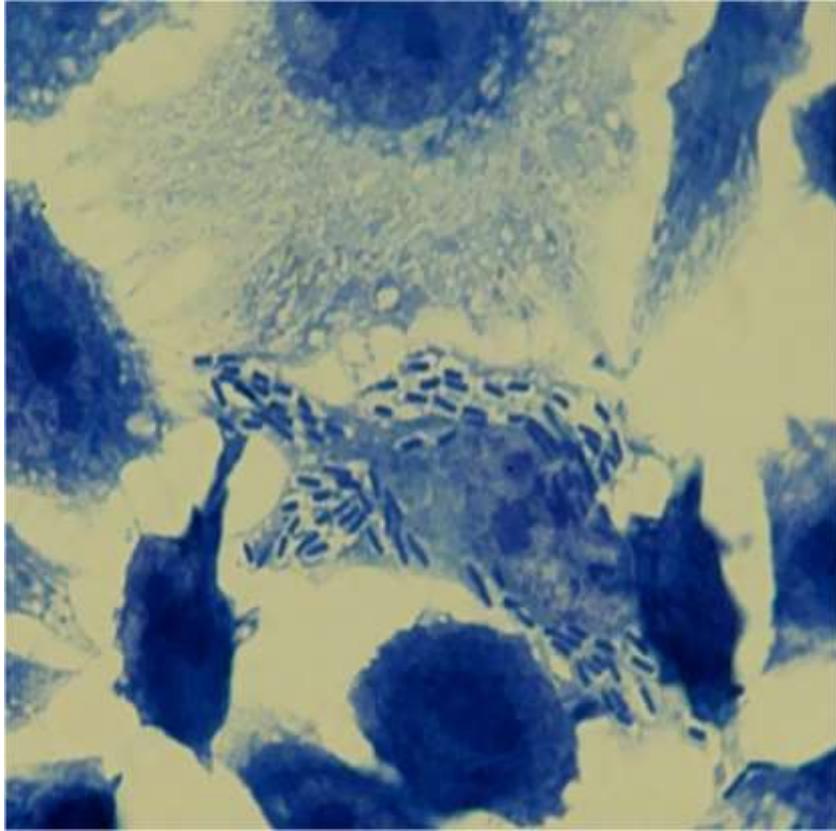


Figura 27: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa M90T em célula HEp-2.

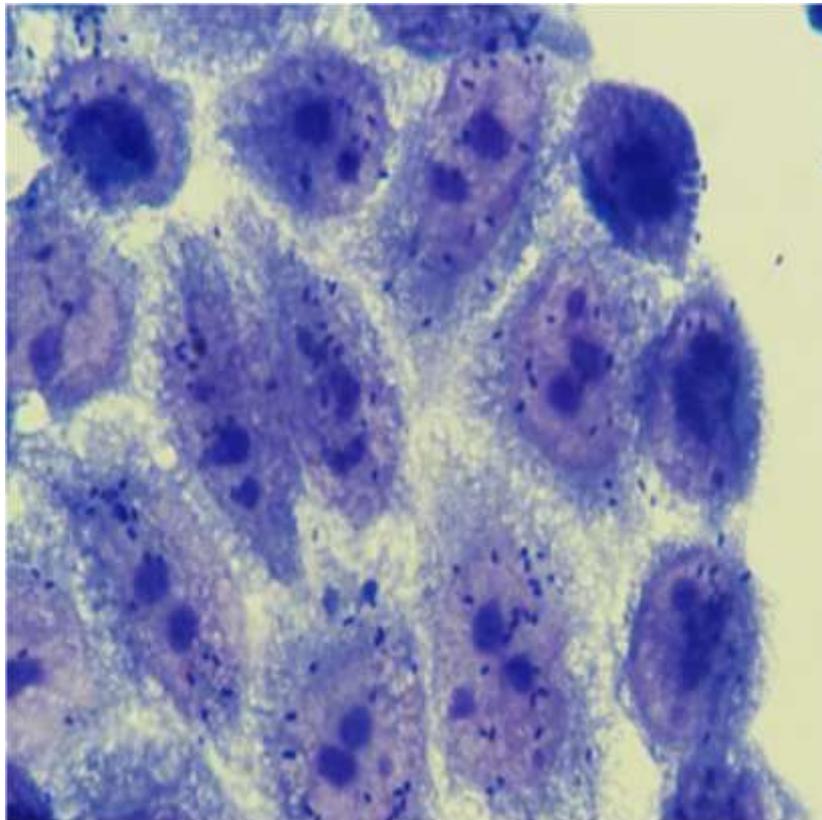


Figura 30: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 05 em célula HEp-2.

Figura 31: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 07 em célula HEp-2. **Figura 32:** Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 05 em célula HEp-2.

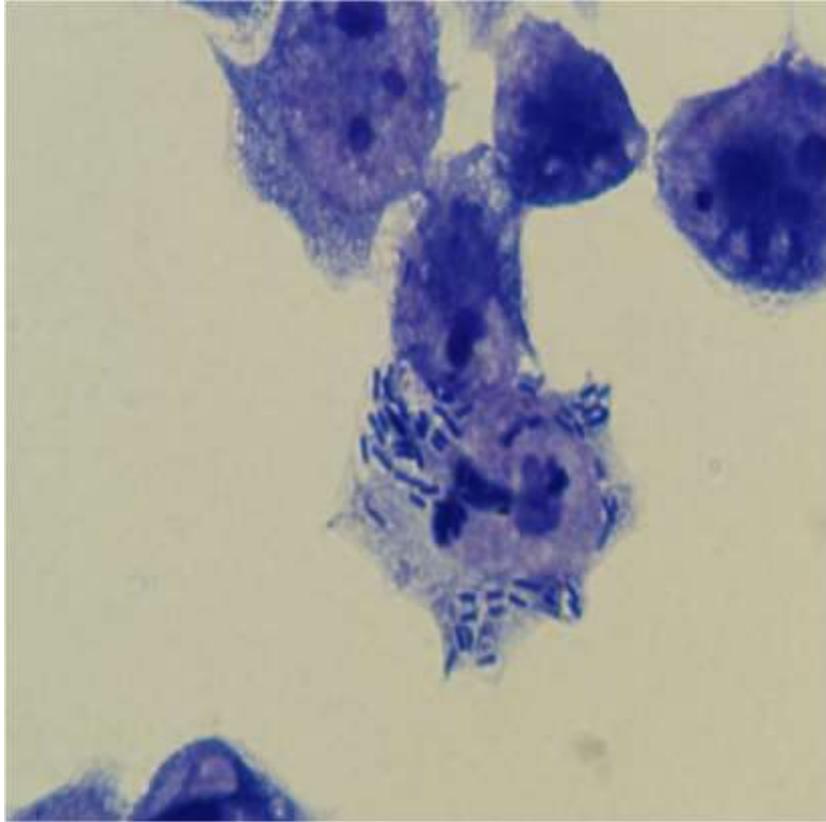


Figura 33: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 07 em célula HEp-2.

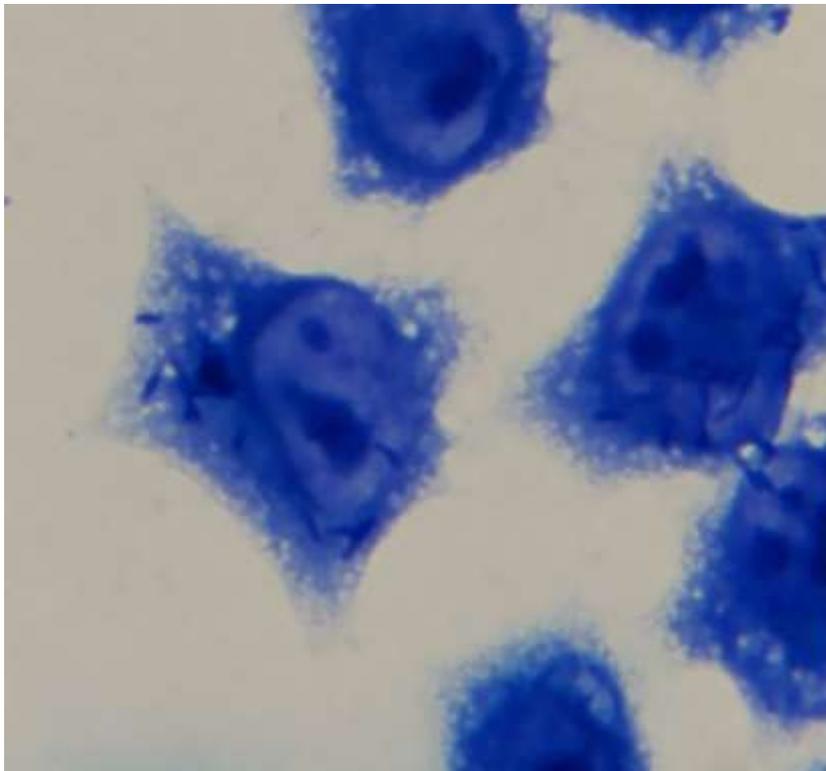


Figura 36: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 11 em célula HEp-2.

Figura 37: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 14 em célula HEp-2. **Figura 38:** Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 11 em célula HEp-2.

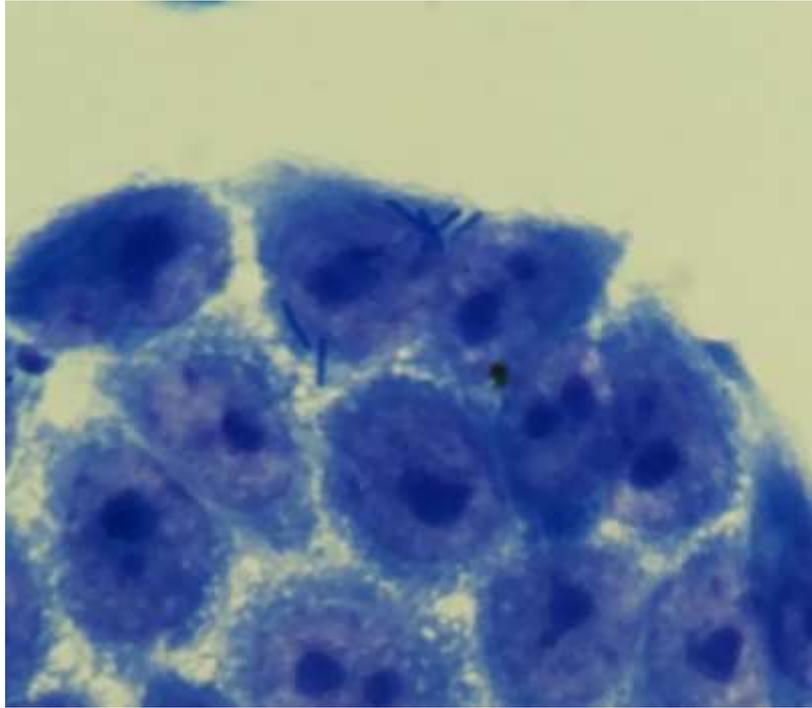


Figura 39: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 14 em célula HEp-2.

Figura 40: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 15 em célula HEp-2.

Figura 41: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 14 em célula HEp-2.

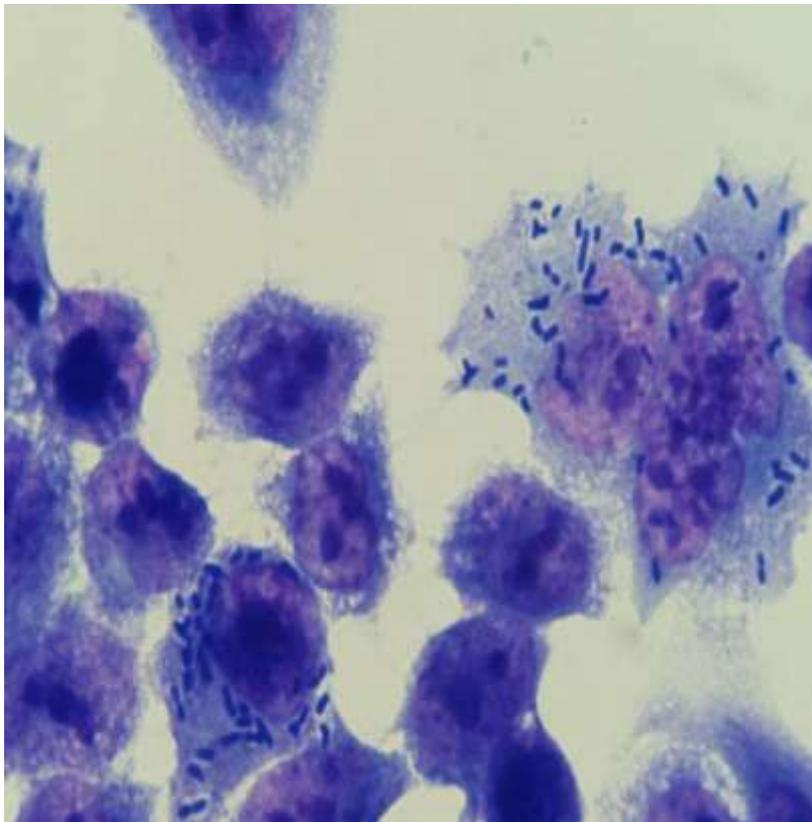


Figura 42: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 15 em célula HEp-2.

Figura 43: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 17 em célula HEp-2.

Figura 44: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 15 em célula HEp-2.

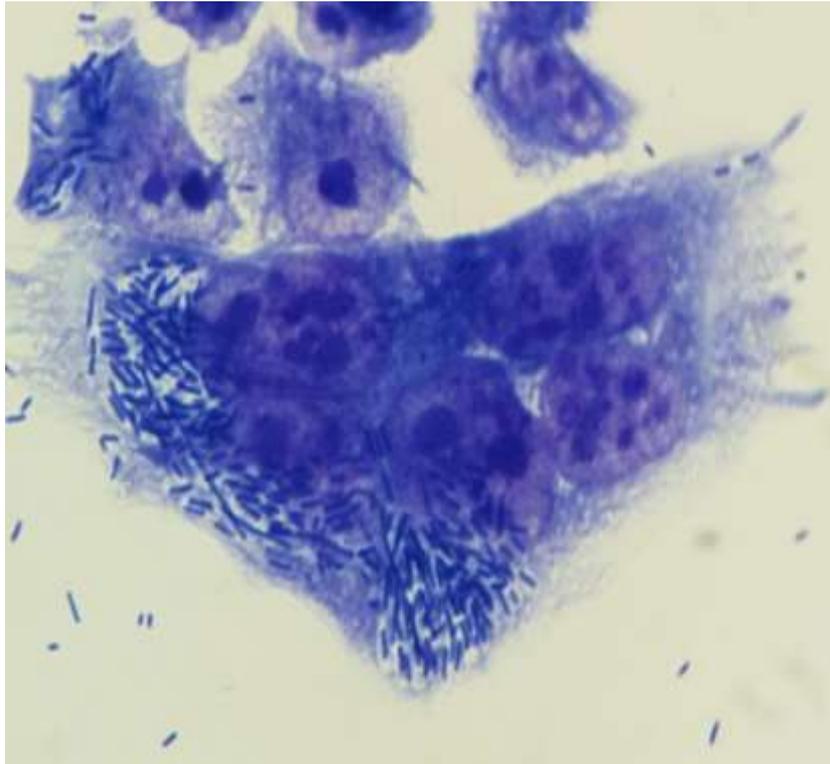


Figura 45: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 17 em célula HEp-2.

Figura 46: Figura 29: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 27 em célula HEp-2.
Figura 47: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 17 em célula HEp-2.

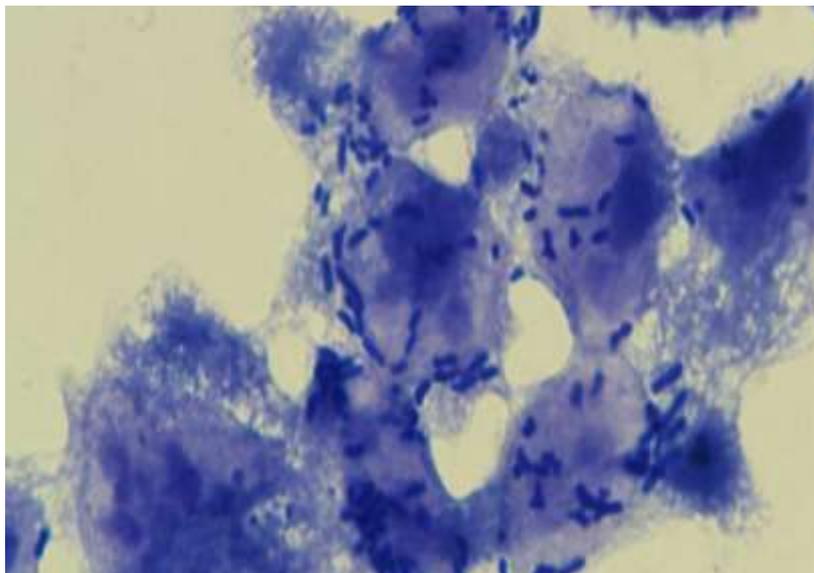


Figura 48: Figura 29: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 27 em célula HEp-2.

Figura 49: Resultado do teste de invasão após 1 hora de indução das cepas M90T, 7, 15, 17 e 27 com a célula HEp-2.
Figura 50: Figura 29: Teste de invasão após 3 horas, com a cepa 27 em célula HEp-2.

Tabela 08

Teste de invasão após 1 hora com células HEp-2, internalização bacteriana.

Cepas	Células Invasadas	Bactérias Internas	Média de bactéria/célula
M90T	22	33	1,50
7	45	72	1,60
15	17	22	1,29
17	14	40	2,86
27	36	114	3,17

Tabela 011

Teste de invasão após 3 horas com células HEp-2, internalização bacteriana.

Cepas	Células Invasadas	Bactérias Internas	Média de bactéria/célula
M90T	130	645	4,96
7	207	1618	7,82
15	113	512	4,53
17	88	756	8,59
27	166	1932	11,64

Tabela 012

Teste de invasão após 1 hora com células HEp-2, adesão bacteriana.

Cepas	Células com adesão bacteriana	Bactérias aderidas	Média de bactéria/célula
5	20	25	1,25
11	16	17	1,06
14	6	6	1,00

Tabela 15

Teste de invasão após 3 horas com células HEp-2, adesão bacteriana.

Cepas	Células com adesão bacteriana	Bactérias aderidas	Média de bactéria/célula
5	236	1544	6,54
11	202	1113	5,51
14	20	22	1,10

6.5.2. Células J774

Os testes com a célula J774 foi realizado nos períodos de 30 e 60 minutos, no qual foi possível observar a capacidade fagocítica da célula, através da visualização das bactérias internalizadas e a eficiência das cepas no escape do modelo celular induzido, conforme o aumento do período do teste (**Tabelas 11 e 12**). Como resultados o período de 30 minutos foi o horário com maior quantidade de células fagocitadas/célula. Sendo que as cepas 7, 17 e 27 foram as células com as maiores taxas de fagocitose.

Tabela 18
Teste de invasão após 30 minutos, células J774

Cepas	Células que fagocitaram	Bactérias Internas	Média de bactéria/célula
M90T	56	76	1,36
5	41	52	1,27
7	67	129	1,93
11	19	20	1,05
14	13	13	1,00
15	38	57	1,50
17	48	83	1,73
27	79	179	2,27

Tabela 21
Teste de invasão após 60 minutos, células J774

Cepas	Células que fagocitaram	Bactérias Internas	Média de bactéria/célula
M90T	19	23	1,21
5	15	18	1,20
7	27	31	1,15
11	12	13	1,08
14	7	7	1,00
15	11	12	1,09
17	19	25	1,32
27	33	40	1,21

7. DISCUSSÃO

A metodologia proposta por Ojha et al., (2013) já foi aplicada em vários estudos como os realizados por Ahmed et al. (2014) para a identificação de *Shigella* em carne e laticínios e, mais recentemente, Alizadeh-Hesar et al. (2015) para identificação de *Shigella* em crianças com diarreia atendidas em hospitais no Iran. Neste estudo, ela foi empregada juntamente com as provas bioquímicas para a identificação e classificação das cepas estudadas. A espécie mais frequentemente encontrada foi a *S. flexneri* (57,4%), seguida de *S. boydii* (28,57%) e *S. sonnei* (14,28%). Nenhuma foi identificada como *S. dysenteriae*. A frequência de aproximadamente 50% também foi relatada em pacientes com diarreia em Kerman, Iran (NAVE et al., 2016). No Brasil, a espécie *S. flexneri* foi a mais identificada nos estados do Piauí (80,8%), em Rondônia (72%), no Pará (66%) e no Amazonas (60%) (CRUZ et al., 2014; BASTOS et al., 2012; NUNES et al., 2012; SILVA et al., 2008).

As espécies de *Shigella* possuem uma estratificação geográfica baseado no nível socioeconômico na qual a *S. flexneri* está associada aos países em desenvolvimento, *S. sonnei* aos países desenvolvidos, *S. boydii* a Bangladesh e Ásia e *S. dysenteriae* ocorre em surtos esporádicos (ANDERSON et al. 2016). Desta forma, a maior porcentagem de *S. flexneri* reflete a situação econômica encontrada no estado do Amazonas.

O padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T foi escolhido como controle positivo deste estudo devido a sua larga utilização como controle de invasão em muitos estudos (SCHNUPF et al., 2012; KONRADT et al., 2011; SELIGE et al., 2010; KOTLOFF et al., 2000; SPERANDIO et al., 2008; CERSINI et al., 2003; MANTIS et al., 1996).

Nossa principal hipótese parte do princípio que cepas clínicas aqui estudadas estão constantemente em competição no hospedeiro humano, diferentemente das cepas padrões. Assim, pode haver diferenças na presença dos genes relacionados à virulência, devido às mutações naturais por diversas influências externas (PRELICH, 2012).

Desta forma, a identificação dos genes de virulência foi realizada para caracterizar o potencial genético de invasão desta cepa. A presença dos genes marcadores de *Shigella uidA* e *InvE* foram comuns a todas as cepas estudadas. O gene *uidA* é um fator que não está associado com a patogenicidade, utilizado nesse estudo para detecção de amostras de *Shigella* e *Escherichia coli* Enteroinvasiva (RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2009). Estes resultados corroboram com a genotipagem realizada com pentaplex proposto por Ojha et al. (2013) que teve o gene *InvE* relativo a identificação de gênero positivo para todas as cepas.

Os genes *ipaBCD* e *ipaH*, localizados no plasmídeo de invasão (*Ipa*), são essenciais a invasão das espécies de *Shigella* na célula hospedeira (VENKATESAN et al., 1988). Todas as amostras testadas possuíram a presença dos genes *IpaA*, *B*, *C* e *D*, exceto a cepa 5 que não amplificou para os genes *IpaA* e *IpaB*. Da mesma forma todas as cepas possuíram pelo menos alguma subunidade do gene *ipaH*.

A variação genica ocorreu nos genes *ial*, *virF* e as enterotoxinas *shET1A*, *shET1B*, *shET2.1*, *shET2.2*. O gene *ial* é responsável pelo direcionamento bacteriano durante a invasão (VARGAS et al., 1999); *virF* reconhece alterações corpóreas, principalmente de temperatura após a entrada da bactéria no hospedeiro, regulando a síntese dos plasmídeos de invasão (PROSSEDA et al., 2004); As enterotoxinas são associadas a secreção de fluidos intestinais, causando a diarreia aquosa e desidratação (NIYOGI et al., 2004). Em 2014, Cruz et al. (2014) relatou uma possível associação do gene *shET1B* com a presença do sintoma desidratação.

Todas as cepas estudadas foram resistentes a tetraciclina. A resistência a tetraciclina já foi relatada no Chile (MARCOLETA et al., 2013), no Peru (LLUQUE et al., 2015) e no Brasil em maior (CRUZ et al. 2014, PEIRANO et al., 2006, PEIRANO et al., 2005) e menor escala (SERIBELLI et al., 2016). A única cepa estudada que

possuiu resistência a ácido nalidíxico (NAL) foi a cepa 27. Estudos com cepas de *Shigella* MDR (*Multi-Drug Resistance*) de fonte alimentar no Egito tiveram as maiores taxas de resistência a kanamicina, tetraciclina e ácido nalidíxico (AHMED et al., 2015). Porém em um estudo no Brasil com crianças com diarreia no Piauí todas as cepas foram susceptíveis ao ácido nalidíxico (NUNES et al., 2012), sendo recomendado como melhores opções terapêuticas o ácido nalidíxico e a ceftriaxona (CARRARI et al., 2012). A baixa resistência a ácido nalidíxico e ceftriaxona (cepa 27 apenas) também foi relatada em estudos de Paula et al. (2010) no Rio Grande do Sul. Em nosso estudo, todas as cepas foram sensíveis a gentamicina, amicacina e ciprofloxacina, sendo estes antibióticos eleitos os mais adequados ao tratamento. Dados obtidos do programa RESISTNET demonstraram sensibilidade de cepas de *Shigella* provenientes de 11 diferentes centros de pesquisa a gentamicina, amicacina e ciprofloxacina e alta resistência trimetropim/sulfametaxazol (80%) (OPLUSTIL et al., 2001), corroborando com os resultados encontrados (**Figura 12**).

A utilização da invasão em células HEp-2 é uma boa metodologia avaliadora da virulência da *Shigella*, tendo resultados similares aos encontrados no teste de Seréni (DAY et al., 1981). As cepas de *S. flexneri* 7, 15 e 27 e de *S. sonnei* 17 apresentam invasão tanto em 1 quanto em 3 horas de contato (**Figuras 31 e 32**). As espécies de *Shigella flexneri* e *sonnei* são as responsáveis pelo maior número de casos de shigelose no mundo (ANDERSON et al. 2016; LIVIO et al. 2014). As cepas com menores taxas de invasão foram as cepas de *S. boydii* 11 e 14 e *S. flexneri* 5. Assim o maior perfil invasivo encontrado em cepas da espécie *flexneri* e *sonnei* corrobora com o perfil do gênero.

Uma das fases importantes na patogenicidade da *Shigella* durante a invasão é a fagocitose por macrófagos, no qual a bactéria internalizada realiza um escape mediado por proteínas do plasmídeo de invasão Ipa's, principalmente o IpaB (PICKING et al., 2005; LUCHINNI et al., 2005). A utilização de testes de invasão em macrófagos para determinação da virulência de *Shigella* é realizada devido ao fato que os genes se comportam de modo diferente em fagócitos e não fagócitos (ALBUQUERQUE, 2006). Cepas de *Shigella* mutantes para os genes IpaB, IpaC e IpaD possuem inabilidade ou diminuição de invadir macrófago J774 *in vitro* (KUWAE

et al., 2001; PICKING et al., 2005; SUZUKI et al., 2005). No atual estudo, quando realizado os testes de fagocitose com o macrófago J774, as cepas clínicas *S. flexneri* 7, 15 e 27 e *S. sonnei* 17 obtiveram as maiores taxas de bactéria/célula no período de 30 minutos de exposição (**Tabela 11**). No período de 60 minutos este número se estabiliza para todas as cepas estudadas, porém o número de células que fagocitaram reduz quando comparada ao período de 30 minutos (**Tabela 12**). Estes resultados são indicativos de apoptose de macrófagos após 60 minutos de exposição. Estudos sobre curva de apoptose com macrófago J774 em contato com a M90T demonstram que a morte celular inicia-se em 45 minutos e no período de 4h possui 100% de morte (SANSONETTI e MOUNIER, 1987). Além dos genes IpaBCD, foi demonstrado o gene IpaH7.8 possui papel no escape de vacúolo fagocítico em cepas de *Shigella* virulentas (FERNANDEZ-PRADA et al., 2000). Neste estudo, os genes IpaB e IpaH7.8 foi encontrado em todas as cepas estudadas neste estudo, exceto na cepa 5, demonstrando o potencial de todas as cepas a escape de macrófago.

Outra característica em comum entre as cepas com maior perfil invasivo, tanto em células HEp-2 quanto em J774, foi a presença das enterotoxinas. Todas as quatro cepas possuíram a presença do conjunto completo de genes shET1 e shET2, a exceção da cepa 17 que teve ausência de shET1B. Curiosamente, todas as cepas não invasivas neste estudo (5, 11 e 14) tiveram ausência de todos ou parte do conjunto de enterotoxinas e dos efetores virF e ial (**Figura 11**). As enterotoxinas são liberadas durante o processo de lise celular, porém elas ainda não foram associadas com invasão (VARGAS et al. 1999). O gene shET2 está localizado no plasmídeo de invasão, no entanto evidências mostram que eles, sozinhos, não tem papel na alteração de funções e inflamação (FIORENTINO et al., 2014), estando mais associados a alterações eletrolíticas (FASANO et al., 1997). O virF, por sua vez, é um importante ativador de transcrição necessário para expressão das proteínas de invasão (KOPPOLU et al., 2013).

Estudos adicionais são necessários para avaliar se a presença destes genes de virulência ocorreu devido ao acaso ou possui alguma correlação. Porém, várias cepas atenuadas candidatas a vacinas contra *Shigella* vigentes possuem atenuação nas enterotoxinas shET1 e shET2 (MANI et al., 2016; TOAPANTA et al., 2014; RANALLO

et al., 2012). Recentemente a candidata a vacina CVD1208S (Δ guaBA, Δ set, Δ sen *S. flexneri* 2a) possuiu apenas 5% de reações na fase clínica 1 e resposta robusta de anticorpos na fase 2 (TOAPANTA et al., 2014).

A ausência dos genes VirF, shETs e invasão em cultura de célula pelas cepas estudadas demonstram o potencial destas cepas clínicas coletadas no Amazonas como possíveis alvos de caracterização visando a busca de marcadores e possíveis alvos de vacinas regionais.

A **Tabela 13** resume os resultados encontrados. Neste estudo sugerimos a separação das cepas clínicas estudadas em dois grupos. No primeiro tivemos as cepas de *Shigella* 5, 11 e 14 que tiveram ausência das enterotoxinas, resistência a apenas um antibiótico, não apresentaram invasão em células HEp-2 em 3h e baixas taxas de fagocitose em J774 em 30m. Estas cepas foram caracterizadas como baixa virulência ou não-virulentas; As cepas de *Shigella* 7, 15, 17 e 27 tiveram a presença do conjunto de enterotoxinas, com resistência a dois ou mais antibióticos, altas taxas de invasão em células HEp-2 em 3h e alta taxa de fagocitose em J774 em 30m. Estas cepas foram caracterizadas como alta virulência. Deste último grupo destacam-se as cepas 7 e 27 que possuíram as maiores taxas de invasão e fagocitose. Acreditamos este estudo de caracterização podem servir de base para estudos futuros visando o comportamento de cepas virulência distintas quanto a expressão gênica, proteica, estudos de polimorfismo e comportamento no hospedeiro.

8. CONCLUSÃO

- Neste estudo, a espécie mais frequentemente encontrada foi a *Shigella flexneri* (57,4%), seguida de *S. boydii* (28,57%) e *S. sonnei* (14,28%). Nenhuma foi identificada como *S. dysenteriae*;
- Todas as cepas foram positivas para IpaBCD, exceto a cepa de *S. flexneri* 5 que não amplificou para as subunidades IpaA e IpaB;
- Para as enterotoxinas shET as amostras 7, 15 e 27 tiveram a presença do conjunto completo (shET 1A, 1B, 2.1, 2.2);
- Todas as cepas bacterianas estudadas foram sensíveis aos antibióticos gentamicina, amicacina e ciprofloxacina e resistentes a tetraciclina;
- Todas as cepas foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado, sendo que a cepa com maior resistência foi a cepa 27 (n=5);
- A invasão em células HEp-2 foi confirmada nas cepas *S. flexneri* 7, 15 e 27 e *S. sonnei* 17, sendo que as cepas 7, 17 e 27 tiveram as maiores taxas de bactérias/célula;
- As cepas 5, 11 e 14 não tiveram fenótipo invasivo, somente adesão;
- Nos testes com a célula J774 teve o período de 30 minutos com o horário com maior quantidade de células fagocitadas/célula. Sendo que as cepas 7, 17 e 27 foram as células com as maiores taxas de fagocitose;
- O perfil invasivo teve em comum a sugestão de associação com os genes shET1 e shET2. As cepas não invasivas tiveram ausência de todos ou parte do conjunto de enterotoxinas e dos efetores virF e ial;
- Estudos adicionais são necessários para avaliar se a presença destes genes de virulência ocorreu devido ao acaso ou possui alguma correlação. Porém, relatamos o potencial destas cepas clínicas coletadas como possíveis alvos de caracterização visando a busca de marcadores e alvos de vacinas regionais.

10. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AHMED, A. M., SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International journal of food microbiology**, 168, 57-62, 2014.

AHMED, A. M., SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin. **International journal of food microbiology**, 194, 78-82, 2015.

ALBUQUERQUE, J. A. T. **Análise comparativa da transcrição dos genes envolvidos na invasão e escape de *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em macrófagos J774**. São Paulo, 2006, 55p.

AL-HASANI, K; HENDERSON, I.R; SAKELLARIS, H; RAJAKUMAR, K; GRANT, T; NATARO, J.P; ROBINS-BROWNE, R; ADLER, B. The *sigA* Gene Which Is Borne on the *she* Pathogenicity Island of *Shigella flexneri* 2a Encodes an Exported Cytopathic Protease Involved in Intestinal Fluid Accumulation. **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 2457-2463, 2000.

AL-HASANI, K; NAVARRO-GARCIA, F; HUERTA, J; SAKELLARIS, H; ADLER, B. The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8223, 2009.

ALIZADEH-HESAR, M., BAKHSHI, B., NAJAR-PEERAYEH, S. Clonal dissemination of a single *Shigella sonnei* strain among Iranian children during Fall 2012 in Tehran, IR Iran. **Infection, Genetics and Evolution**, 34, 260-266, 2015.

AL-MAZROU, Y.Y; KHAN, M.U; AZIZ, K.M.S; FARID, S.M. Factors associated with Diarrhoea prevalence in Saudi Arabia. **Journal of Family &Community Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27, 1995.

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**, 6, 2016.

APPANNANAVAR, S.B; GOYAL, K; GARG, R; RAY, P; RATHI, M; TANEJA, N. Shigellemia in a post renal transplant patient: a case report and literature review. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 237-239, 2014.

ARANDA, K.R.S; FAGUNDES-NETO, U; SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

BASTOS, F.C; LOUREIRO, E.C.B. Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp. isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 4, p. 71-74, 2010.

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, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde - Informações Técnicas DDA, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/652-secretaria-svs/vigilancia-de-a-az/doencadiarreica-aguda-dda/l2-doenca-diarreica-aguda-dda/11139-informacoestecnicasdda>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/guia_alimentos_vigilancia_sanitaria.pdf>. Acessado em: 17 de julho de 2014.

BROOKS, G.F; CARROLL, K.C; BUTEL, J.S; MORSE, S.A; MIETZNER, T.A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, p. 213-221, 2012.

BUBLITZ, D.C; WRIGHT, P.C; BODAGER, J.R; RASAMBAINARIVO, F.T; BLISKA, J.B; GILLESPIE, T.R. Epidemiology of Pathogenic Enterobacteria in Humans, Livestock, and Peridomestic Rodents in Rural Madagascar. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101456, 2014.

CARRARI, M. H., TAHAN, S., MORAIS, M. B. Antibiotic therapy in acute diarrhea associated with Shigella: what is the best option? **Jornal de pediatria**, 88(4), 366-367, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) - Shigellosis. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/shigellosis/#treat>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.

CERSINI, A; MARTINO, M. C; MARTINI, I; ROSSI, G; BERNARDINI, M. L. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of Shigella flexneri Purine Biosynthesis Mutants. **Infection and Immunity** p. 7002-7013, 2003.

CHAMEKH, M; PHALIPON, A; QUERTAINMONT, R; SALMON, I; SANSONETTI, P; ALLAOUI, A. Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. **The Journal of immunology**, v. 180, n. 6, p. 4292-4298, 2008.

CRAVIOTO, A; GROSS, R.J; SCOTLAND, S.M; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol**, v. 3, p. 95-9, 1979.

CRUZ, C.B.N; DE SOUZA, M.C.S; SERRA, P.T; SANTOS, I; BALIEIRO, A; PIERI, F.A; NOGUEIRA, P.A; ORLANDI, P.P. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **Bio Med research international**, v. 2014, 2014.

DAY, N. P., SCOTLAND, S. M., ROWE, B. Comparison of an HEp-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in Shigella spp. and Escherichia coli. **Journal of clinical microbiology**, 13(3), 596, 1981.

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

FASANO A, NORIEGA FR, LIAO FM, WANG W, LEVINE MM. Effect of shigella enterotoxin 1 (shET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. **Gut**, 1:505–511, 1997.

FERNANDEZ-PRADA, C. M., HOOVER, D. L., TALL, B. D., HARTMAN, A. B., KOPELOWITZ, J., VENKATESAN, M. M. *Shigella flexneri* IpaH7. 8 facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. **Infection and immunity**, 68(6), 3608-3619, 2000.

FIORENTINO, M., LEVINE, M. M., SZTEIN, M. B., FASANO, A. Effect of wild-type *Shigella* species and attenuated *Shigella* vaccine candidates on small intestinal barrier function, antigen trafficking, and cytokine release. **PloS one**, 9(1), e85211, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) - Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. **FDA**, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.

FRANCIS, C.L.; JERSE, A.E.; KAPER, J.B.; FALKOW, S. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* 0127:H6 with mammalian cells in vitro. *J. Infect.* **J. Infect. Dis.**, v. 164 p. 693-703, 1991.

GIANNELLA, R. A.; BROITMAN, S. A.; ZAMCHECK, N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. **Gut**, v. 13, n. 4, p. 251-256, 1972.

GORDEN, J; SMALL, P.L.C. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 1, p. 364-367, 1993.

HACKER, J; KAPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 641-679, 2000.

HEIMAN, K.E; KARLSSON, M; GRASS, J; HOWIE, B; KIRKCALDY, R.D; MAHON, B; BROOKS, J.T; BOWEN, A. *Shigella* with Decreased Susceptibility to Azithromycin Among Men Who Have Sex with Men — United States, 2002–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 6, p. 132-133, 2014.

HIEN, B.T.T; TRANG, D.T; SCHEUTZ, F; CAM, P.D; MOLBACK, K; DALSGAARD, A. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and other causes of childhood diarrhoea: a case-control study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1086-1096, 2007.

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

KANE, K.A; DORMAN, C.J. VirB-mediated positive feedback control of the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 19, p. 5264-5273, 2012.

KARAMBU, S; MATIRU, V; KIPTOO, M; OUNDO, J. Characterization and factors associated with diarrhoeal diseases caused by enteric bacterial pathogens among children aged five years and below attending Igembe District Hospital, Kenya. **Pan African Medical Journal**, v. 16, n. 1, 2014.

KONRADT, C; DI BARTOLO, V; FRIGIMELICA, E; SCOTT-ALGARA, D; NOTHELPER, U. P. M. M; RODRIGUES, C. D; PUHAR, A; SANSONETTI, P. J; SALGADO-PABON, W; PHALIPON, A. The *Shigella flexneri* Type Three Secretion System Effector IpgD Inhibits T Cell Migration by Manipulating Host Phosphoinositide Metabolism. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 4, p. 263–272, 2011.

KOPPOLU, V; OSAKA, I; SKREDENSKE, J.M; KETTLE, B; HEFTY, P.S; LI, J; EGAN, S.M. Small-molecule Inhibitor of the *Shigella flexneri* master virulence regulator VirF. **Infection and immunity**, v. 81, n. 11, p. 4220-4231, 2013.

KOTLOFF, K. L; NORIEGA, F. R; SAMANDARI, T; SZTEIN, M. B; LOSONSKY, G. A; NATARO, J. P; PICKING, W. D; BARRY, E. M; LVINE, M. M. *Shigella flexneri* 2a Strain

CVD 1207, with Specific Deletions in *virG*, *sen*, *set*, and *guaBA*, Is Highly Attenuated in Humans. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1034–1039, 2000.

KUWAE, A., YOSHIDA, S., TAMANO, K., MIMURO, H., SUZUKI, T., SASAKAWA, C. *Shigella* Invasion of Macrophage Requires the Insertion of IpaC into the Host Plasma Membrane FUNCTIONAL ANALYSIS OF IpaC. **Journal of Biological Chemistry**, 276(34), 32230-32239, 2001.

LEE, J.H; PARK, H.J; PARK, Y.H. Molecular Mechanisms of Host Cytoskeletal Rearrangements by *Shigella* Invasins. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 10, p. 18253-18266, 2014.

LEVINE, M.M; KOTLOF, K.L; BARRY, E.M; PASETTI, M.F; SZTEIN, M.B. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 540-553, 2007.

LINDSAY, S.W; LINDSAY, T.C; DUPREZ, J; HALL, M.J.R; KWAMBANA, B.A; JAWARA, M; NURUDEEN, I.U; SALLAH, N; WYATT, N; D’ALESSANDRO, U; PINDER, M; ANTONIO, M. *Chrysomya putoria*, a putative vector of diarrheal diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1895, 2012.

LIVIO, S; STROCKBINE, N.A; PANCHALINGAM, S; TENNANT, S.M; BARRY, E.M; MAROHN, M.E; ANTONIO, M; HOSSAIN, A; MANDOMANDO, I; OCHIENG, J.B; OUNDO, J.O; QURESHI, S; RAMAMURTHY, T; TAMBOURA, B; ADEGBOLA, R.A; HOSSAIN, M.J; SAHA, D; SEM, S; FARUQUE, A.S.G; ALONSO, P.L; BREIMAN, R.F; ZAIDI, A.K.M; SUR, D; SOW, S.O; BERKELEY, L.Y; O’REILLY, C.E; MINTZ, E.D; BISWAS, K; COHEN, D; FARAG, T.H; NASRIN, D; WU, Y; BLACKWELDER, W.C; KOTLOFF, K.L; NATARO, J.P; LEVINE, M.M. *Shigella* Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 7, p. 933-941, 2014.

LLUQUE, A., MOSQUITO, S., GOMES, C., RIVEROS, M., DURAND, D., TILLEY, D. H., ... & RUIZ, J. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). **International Journal of Medical Microbiology**, 305(4), 480-490, 2015.

LUM, M; MORONA, R. Dynamin-related protein Drp1 and mitochondria are important for *Shigella flexneri* infection. **International Journal of Medical Microbiology**, 2014.

MAÏNASSARA, H.B; TOHON, Z. Assessing the Health Impact of the following Measures in Schools in Maradi (Niger): Construction of Latrines, Clean Water Supply, Establishment of Hand Washing Stations, and Health Education. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 2014.

MANDAL, J; SANGEETHA, V; NIVEDITHADIVYA; DAS, A; PARIJA, S.C. Characterization of Extended-spectrum β -lactamase-producing Clinical Isolates of *Shigella flexneri*. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 31, n. 3, p. 405, 2013.

MANI, S., WIERZBA, T., WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for Shigella. **Vaccine**, 34(26), 2887-2894, 2016.

MANTIS, N., PRÉVOST, M. C., SANSONETTI, P. Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. **Infection and immunity**, 64(7), 2474-2482, 1996.

MARCOLETA, A; TORO, C; PRADO, V; SERRANO, M; FERNÁNDEZ, P; BENADOF, D; CAMPONOVO, R; CAMPOS, V; PORTE, L; ZAMORANO, J; ORTEGA, C; URQUETA, B; ULLOA, M.T. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes em La Región Metropolitana, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 6, p. 616-621, 2013.

MARTEYN, B.S; GAZI, A.D; SANSONETTI, P.J. *Shigella* A model of virulence regulation in vivo. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 104-120, 2012.

NAVE, H. H., MANSOURI, S., SADEGHI, A., MORADI, M. Molecular diagnosis and anti-microbial resistance patterns among *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea. **Gastroenterology and Hepatology from bed to bench**, 9(3), 205, 2016.

NIYOGI SK, 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. **Clin. Microbiol. Infect.** 10:574–576, 2004.

NIYOGI, S.K. Shigellosis. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.

NONAKA, T; KUWABARA, T; MIMURO, H; KUWAE, A; IMAJOH-OHMI, S. Shigella-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2513-2527, 2003.

NUNES, M. D. R., MAGALHÃES, P. P., PENNA, F. J., NUNES, J. M., MENDES, E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de pediatria**, 88(2), 125-128, 2012.

OJHA, S.C; YEAN, C.Y; ISMAIL, A; SINGH, K.K.B. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **Bio Med research international**, v. 2013, 2013.

ONODERA, N.T; RUY, J; DURBIC, T; NISLOW, C; ARCHIBALD, J.M; ROHDE, J.R. Genome sequence of *Shigella flexneri* serotype 5a strain M90T Sm. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 3022-3022, 2012.

OPLUSTIL, C. P., NUNES, R., MENDES, C. Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 5(1), 8-12, 2001.

ORLANDI, P.P; MAGALHÃES, C.F; MATOS, N.B; SILVA, T; PENATTI, M; NOGUEIRA, P.A; PEREIRA DA SILVA, L.H. 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.

ORLANDI, P.P; SILVA, T; MAGALHÃES, G.F; ALVES, F; CUNHA, R.P.A; DURLACHER, R; DA SILVA, L.H.P. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of

Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621-625, 2001.

PAULA, C.M.D; GEIMBA, M.P; AMARAL, P.H; TONDO, E.C. Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 966-977, 2010.

PEIRANO, G., AGERSØ, Y., AARESTRUP, F. M., & DOS PRAZERES RODRIGUES, D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 55(3), 301-305, 2005.

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

PERDOMO, O.J.J; CAVAILLON, J.M; HUERRE, M; OHAYON, H; GOUNON, P; SANSONETTI, P.J. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1307-1319, 1994.

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. 1-11, 2007.

PICKING, W. L., NISHIOKA, H., HEARN, P. D., BAXTER, M. A., HARRINGTON, A. T., BLOCKER, A., PICKING, W. D. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. **Infection and immunity**, 73(3), 1432-1440, 2005.

PRELICH, G. Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. **Genetics**, v. 190, n. 3, 841-854, 2012.

PROSEDA, G; FALCONI, M; GIANGROSSI, M; GUALERZI, C. O; MICHELI, G; COLONNA, B. The virF promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 523-37, 2004.

RAM, P.K; CRUMP, J.A; GUPTA, S.K, MILLER, M.A; MINTZ, E.D. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. **Epidemiol. Infect**, v. 136, n. 5, p. 577-603, 2008.

RANALLO RT, FONSEKA S, BOREN TL, ET AL. Two live attenuated *Shigella flexneri* 2a strains WRSf2G12 and WRSf2G15: A new combination of gene deletions for 2nd generation live attenuated vaccine candidates. **Vaccine** 30:5159–5171, 2012.

RIYAZ-UL-HASSAN, S; SYED, S; JOHRI, S; VERMA, V; QAZI, G. N. Application of a multiplex PCR assay for the detection of *Shigella*, *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Esch. coli* in milk. **Journal of Dairy Research**. v. 76, n. 2, p. 188-194, 2009.

SANSONETTI, P. J., MOUNIER, J. Metabolic events mediating early killing of host cells infected by *Shigella flexneri*. **Microbial pathogenesis**, 3(1), 53-61, 1987.

SANSONETTI, P. J; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infection and immunity**, v. 35, n. 3, p. 852-860, 1982.

SANSONETTI, P.J, HALE, T.L; DAMMIN, G.J; KAPFER, C; COLLINS, H.H; JR; FORMAL, S.B. Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. **Infection and immunity**, v. 39, n. 3, p. 1392-1402, 1983.

SANSONETTI, P.J. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, n. 3, p. 319-323, 2001.

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.

SCHNUPF, P; SANSONETTI, P. J Quantitative RT-PCR profiling of the Rabbit Immune Response: Assessment of Acute *Shigella flexneri* Infection. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e36446, 2012.

SCHREK, R. A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. **The American Journal of Cancer**, v. 28, n. 2, p. 389-392, 1936.

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.

SELLGE, G; MAGALHAES, J. G; KONRADT, C; FRITZ, J. H; SALGADOPABON, W; EBERL, G;BANDEIRA, A; DI SANTO, J. P; SANSONETTI, P. J, PHALIPON, A. Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. **Journal of immunology** , v.184, n. 4, p. 2076–2085, 2010.

SERIBELLI, A. A., FRAZÃO, M. R., MEDEIROS, M. I. C., FALCÃO, J. P. Molecular and phenotypic characterization of *Shigella sonnei* isolated over 31 years suggest the circulation of two prevalent subtypes in the São Paulo State in Brazil. **Journal of medical microbiology**, 2016.

SHIM, D.H; SUZUKI, T; CHANG, S.Y; PARK, S.M; SANSONETTI, P.J; SASAKAWA, C; KWEON, M.N. New Animal Model of Shigellosis in the Guinea Pig: Its Usefulness for Protective Efficacy Studies. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2476-2482, 2007.

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

SOUSA, M.A.B; MENDES, E.M; COLLARES, G.B; PÉRET-FILHO, L.A; PENNA, F.J; MAGALHÃES, P.P. *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, 2013.

SPERANDIO, B; REGNAULT, B; GUO, J; ZHANG, Z; STANLEY, JR. S. L; SANSONETTI, P. J; PÉDRON, T. Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response

through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1121-1132, 2008.

SUZUKI, T., NAKANISHI, K., TSUTSUI, H., IWAI, H., AKIRA, S., INOHARA, N., CHAMAILLARD, M., NUÑEZ, G., SASAKAWA, C. A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, 280(14), 14042-14050, 2005.

TANG, F; CHENG, Y; BAO, C; HU, W; LIU, W; LIANG, Q; WU, Y; NORRIS, J; PENG, Z; YU, R; SHEN, H; CHEN, F. Spatio-Temporal Trends and Risk Factors for *Shigella* from 2001 to 2011 in Jiangsu Province, People's Republic of China. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e83487, 2014.

TOAPANTA, F. R., SIMON, J. K., BARRY, E. M., PASETTI, M. F., LEVINE, M. M., KOTLOFF, K. L., SZTEIN, M. B. Gut-homing conventional plasmablasts and CD27–plasmablasts elicited after a short time of exposure to an oral live-attenuated *Shigella* vaccine candidate in humans. **Frontiers in immunology**, 5, 2014.

TRANG, D.T; HIEN, B.T.T; MOLBACK, K; CAM, P.D; DALSGAAR, A. Epidemiology and aetiology of diarrhoeal diseases in adults engaged in wastewater-fed agriculture and aquaculture in Hanoi, Vietnam. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. s2, p. 23-33, 2007.

VARGAS, M., GASCON, J., DE ANTA, M. T. J., & VILA, J. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, 37(11), 3608-3611, 1999.

VENKATESAN, M. M; BUYASSE, J. M; KOPECKO, D. J. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 23, p. 9317-21, 1988.

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

WEST, N.P; SANSONETTI, P; MOUNIER, J; ELEY, R.M; PARSOT, C; GUADAGNINI, S; PRÉVOST, M.C; CHALUFOUR, A.P; DELEPIERRE, M; TANGUY, M; TANG, C.M. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1313-1317, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Diarrhoeal disease. **World Health Organization**, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Guidelines for the Control of Shigellosis, including Epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. **World Health Organization**, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/cholera/publications/shigellosis/en/>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.

XU, H; JEONG, H.S; LEE, H.Y; AHN, H. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 4, p. 434-442, 2009.

YANG, J-Y; LEE, S-N; CHANG, S-Y; KO, H-J; RYU, S; KWEON, M-N. A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203-215, 2014.

ZUO, G; XU, Z; HAO, B. Shigella Strains Are Not Clones of Escherichia coli but Sister Species in the Genus Escherichia. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 61-65, 2013.