

**Estudo de epidemiologia molecular de *Shigella* spp.
revela a possível origem clonal de amostras multirresistentes a
antibióticos**

Gustavo Olszanski Acrani

Gustavo Olszanski Acrani

**Estudo de epidemiologia molecular de *Shigella* spp.
revela a possível origem clonal de amostras multirresistentes a
antibióticos**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre
em Ciências: Área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

**Ribeirão Preto
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

Acrani, Gustavo Olszanski

Estudo de epidemiologia molecular de *Shigella* spp. revela a possível origem clonal de amostras multirresistentes a antibióticos.

Ribeirão Preto, 2004.

134p.; 30,5cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Brocchi, Marcelo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e contou com apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

“Wop bop a loo bop a lop bam boom!

Tutti frutti, oh rutti,

Tutti frutti, oh rutti,

Tutti frutti, oh rutti,

Tutti frutti, oh rutti,

Tutti frutti, oh rutti,

Wop bop a loo bop a lop bam boom!”

Tutti Frutti (Richard Penniman, Dorothy La Bostrie, Joe Lubin)

na voz de Elvis (O Rei)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador **Prof. Dr. Marcelo Brocchi**, pela confiança, atenção, respeito e pelos ensinamentos tão imprescindíveis para a realização do presente trabalho, assim como para a minha formação como pesquisador.

À **Profa. Dra. Ana Lucia da Costa Darini** e **Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi** pela atenção dispensada, comentários e sugestões na correção da proforma desta dissertação, e pela participação na banca examinadora.

À aluna **Juliana Rodrigues**, por ter participado do início deste trabalho e realizado uma parte significativa do mesmo.

À **Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite** e à aluna **Ana Carolina Malaspina**, da UNESP de Araraquara, por terem contribuído e auxiliado na análise dos géis no programa GelCompar.

Ao coordenador do laboratório de Microbiologia da Unidade de Emergência do HCRP-USP, **Prof. Dr. Roberto Martinez**, por ter gentilmente cedido as amostras de *Shigella* spp. utilizadas neste estudo.

À **Dra. Tânia Mara Ibelli Vaz**, do setor de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela realização da sorotipagem das amostras de *S. flexneri*.

À **Marta Inês Cazentini Medeiros** e **Suzel Nogueira Neme**, do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto por terem gentilmente cedido as amostras de *S. dysenteriae* utilizadas, e ao **Prof. Dr. Anthony T. Maurelli** da Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda – Maryland-EUA por ter gentilmente cedido as linhagens padrão das quatro “espécies” de *Shigella* spp. estudadas.

À **Profa. Dra Cláudia Maria Leite Maffei**, **Prof. Dr. Eurico Arruda Neto** e **Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz** pelos conselhos, carinho e amizade, e também pela utilização de seus respectivos laboratórios.

À querida **Marly**, pelo auxílio técnico e carinho dispensado no desenvolvimento do trabalho.

À **Rosângela C. Mesquita** e **Ana Cristine**, secretárias da Pós-Graduação, pela dedicação, apoio e amizade, e por solucionar dúvidas cruciais de caráter burocráticos ou não.

Aos **amigos de laboratório: André D., Gustavo (Dãã), Ita, Juliana, Karen, Liandra** e **Peterson** pelo carinho, amizade, cooperação e acima de tudo pela paciência, e um agradecimento especial também para **Luciana** e **Rosana**, que além de serem pessoas magníficas como as citadas acima, ajudaram bastante no sequenciamento das amostras. E um agradecimento especial para os amigos **José Luiz, Ana Isabela (Bela)** e **André Pitondo**, que foram os responsáveis por me ensinarem na prática as técnicas que aprendi durante o mestrado.

Ao **amigo José Luiz (de novo)** pelas trocas de conselhos, amizade, desabafos e solidariedade por todo o tempo do mestrado e tudo que passamos na graduação. Obrigado!

Aproveito o momento também para agradecer a todos os **meus amigos** da pós-graduação, da graduação e também o pessoal de fora da faculdade, que de uma forma ou de outra fazem parte de minha vida e colaboram de infinitas formas com o desenvolvimento de *meu caráter*.

Aos meus pais **Regina** e **Mario** e minhas irmãs **Elise** e **Isabela** pela compreensão, carinho e amor indispensáveis para a conclusão deste trabalho assim como para todos os outros momentos de minha vida.

À **Patricia**, pela inspiração poética, paciência e carinho.

E à minha família.

Obrigado a todos...

“Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que serve o Universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo ainda mais estranho e inexplicável.

Existe uma segunda teoria que diz que isso já aconteceu.”

Douglas Adams

O Guia do Mochileiro das Galáxias vol. 2 - O Restaurante no Fim do Universo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- O gênero <i>Shigella</i>	2
1.2– Patogenicidade	8
1.3- Tipagem de microrganismos	16
1.3.1 – Ribotipagem	19
1.3.2 – PCR de seqüências repetitivas (Rep-PCR)	22
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1- Amostras bacterianas	32
3.2 – Teste de sensibilidade a antibióticos	33
3.3 - Extração de DNA genômico	33
3.4 – Ribotipagem	34
3.4.1 – Preparação da sonda de rDNA.	34
3.4.2 – Marcação da sonda de rDNA.	36
3.4.3 – Digestão com enzima de restrição	36
3.4.4 - Southern Blotting e hibridação de ácidos nucléicos	37
3.5 –REP e ERIC-PCR	39
3.6 – Eletroforese horizontal em gel de agarose	41
3.7 – Análise da similaridade genética	41
3.8 – Cálculo do índice de discriminação	42
3.9 – Sequenciamento de fragmento conservado de ERIC-PCR	43
3.10 - Análise estatística	45

4. RESULTADOS	46
4.1 – Sensibilidade a antibióticos	51
4.2 – Ribotipagem	57
4.3 – REP-PCR	63
4.4 – ERIC-PCR	67
4.5 – Dendrograma consenso entre REP-PCR e ERIC-PCR	70
4.6 - Cálculo do índice de discriminação	73
4.7 - Sequenciamento de fragmento conservado de ERIC-PCR	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

RESUMO

RESUMO

O gênero *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Ele é dividido em 4 “espécies” patogênicas para o homem, de acordo com características bioquímicas e antigênicas: *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. Essa divisão é apenas didática, pois experimentos de hibridação de DNA sugerem que o gênero é composto por uma única espécie que também compreenderia *Escherichia coli*. *Shigella* spp é freqüentemente associada a infecções intestinais denominadas shigelose ou disenteria bacilar. Na região de Ribeirão Preto existe um quadro endêmico de casos de *Shigella* spp. No período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000, foram isoladas 64 amostras de *Shigella* spp. pela Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, as quais foram caracterizadas quanto à “espécie” e tiveram sua sensibilidade a antibióticos analisada, revelando que 35,13% das amostras eram multirresistentes. Foram também analisadas seis amostras de *S. dysenteriae* e uma de *S. boydii* cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. No presente trabalho a tipagem molecular de tais amostras foi realizada utilizando a técnica de PCR de elementos repetitivos, com iniciadores específicos para as seqüências ERIC e REP, e tipagem por ribotipagem, para verificar se tais metodologias seriam eficientes na discriminação das amostras e identificar diferenças genotípicas entre as quatro “espécies” de *Shigella* spp. Tal análise revelou que REP e ERIC-PCR foram mais eficientes do que ribotipagem na discriminação das amostras analisadas e revelou também que *S. sonnei* e *S. flexneri* compartilham mais características em comum entre si do que essas em relação a *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Os dados ainda sugerem uma possível origem clonal de amostras multirresistentes, já que estas apresentaram grande similaridade genética. O presente trabalho revelou

também através do ERIC-PCR uma região do genoma destas bactérias conservada entre as amostras de *Shigella* spp. que poderia ser utilizada para fins diagnósticos. A função biológica das seqüências ERIC ainda é muito especulativa e desconhecida. Os resultados aqui descritos sugerem a existência de uma pressão seletiva para manter essas seqüências ERIC intactas em uma região específica do genoma. Portanto, uma melhor caracterização desta região genômica poderia revelar a significância biológica das seqüências ERIC.

Palavras chave: *Shigella*, tipagem molecular, ERIC-PCR, REP-PCR, ribotipagem, sensibilidade a antibióticos, multirresistência.

ABSTRACT

ABSTRACT

The genus *Shigella* is a member of the *Enterobacteriaceae* family. It is divided in 4 pathogenic "species", according to biochemical and antigenic characteristics: *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. This division is merely didactic, since DNA hybridization experiments have shown that the genus is composed of only one especie which would also include *E. coli*. *Shigella* spp. is frequently associated to intestinal infections, also called shigelosis or bacillar dysentery. In the Ribeirão Preto area, *Shigella* spp. is an endemic microorganism. From January 1999 to February 2000 there were 64 isolates of *Shigella* spp. registered by the Unidade de Emergência of the Hospital das Clínicas, which were characterized at the "species" level, and by antibiogram, revealing that 35,13% of them were multiresistant samples (MR). Six isolates of *S. dysenteriae* and one of *S. boydii*, offered by the Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto were also analyzed. In the present work, these samples were analyzed by different molecular typing methods, which included repetitive elements PCR, using the ERIC and REP primers, and typing by ribotyping. These methods were used to determine the similarity existing between these isolates and to analyze whether these methods are efficient in discriminating the four *Shigella* spp. "species" in different groups. The analysis revealed that REP and ERIC-PCR were more efficient than ribotyping in discriminating the different isolates, and also revealed that *S. sonnei* and *S. flexneri* are more related than with *S. dysenteriae* and *S. boydii*. The data also suggest a possible clonal origin of the multiresistant isolates, since they share a great deal of genetic similarity. The present work showed that the ERIC-PCR amplifications revealed a conserved region on the *Shigella* spp. genome that could possibly be used as a diagnostic marker. The biological function of ERIC

sequences is a matter of speculation and it is presently unknown. The results here described suggested the existence of a selective pressure to maintain ERIC sequences intact in a specific genomic region. Thus, a better characterization of this genomic region could reveal the biological significance of the ERIC sequences.

Keywords: *Shigella*, molecular typing, ERIC-PCR, REP-PCR, ribotyping, antibiotic susceptibility.

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- O gênero *Shigella*

O "gênero" *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, a qual é representada por bactérias com grande relevância em causar infecções no trato intestinal, e é composta por microrganismos tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., entre outros. O "gênero" *Shigella* é constituído de bacilos Gram-negativos, não encapsulados e não esporulados (Salyers e Whitt, 1994), anaeróbios facultativos, freqüentemente associados a infecções intestinais denominadas shigelose ou disenteria bacilar. A disenteria é uma forma de diarreia na qual as fezes contêm sangue e muco. Em adultos saudáveis, essa disenteria é resolvida pelo próprio organismo, geralmente não ocorrendo risco de invasão da corrente sanguínea por parte das bactérias. Porém, em crianças e recém-nascidos, essa infecção pode resultar em casos graves de desidratação seguida de morte, fazendo com que a shigelose seja um dos casos mais comuns de mortalidade de crianças com diarreia em países em desenvolvimento. Em todo o mundo, cerca de 164,7 milhões de pessoas são infectadas por *Shigella* spp. por ano, ocorrendo por volta de 1.100.000 mortes. Destes casos, 163,2 milhões ocorrem em países em desenvolvimento, e cerca de 69% dos pacientes são crianças com menos de cinco anos de idade (Kotloff *et al.*, 1999).

Do ponto de vista bioquímico, todas as "espécies" de *Shigella* spp. fermentam a glicose e nunca fermentam a lactose (Murray, 2003). Reduzem nitratos em nitritos, e não possuem a atividade da citocromo-oxidase, o que é muito importante para se diferenciar *Enterobacteriaceae* de vários outros bacilos gram-negativos fermentativos e não-fermentativos (Murray, 1998).

Esses organismos formam ácidos a partir de carboidratos, porém não produzem gás, não produzem H₂S, e nem urease, desaminases ou lisina descarboxilase. *S. sonnei* é a única que apresenta positividade para ornitina descarboxilase (Jawetz *et al.*, 2000).

A infecção causada por *Shigella* spp. é transmitida por via oral-fecal, principalmente através de mãos e água contaminadas, sendo de menor incidência os casos de alimentos como via de transmissão (Murray, 1998). Uma baixa dose desse microrganismo (ID₅₀ por volta de 10 a 100 células viáveis) pode ser considerada infectante e passível de causar doença (DuPont *et al.*, 1989). Tal fato explica o motivo deste patógeno ser tão contagioso, sendo responsável por surtos e epidemias em áreas populosas, principalmente em regiões com saneamento básico deficiente, onde a transmissão via pessoa-pessoa ou via água ou alimento contaminados com fezes humanas ocorre de forma mais exacerbada. Essa baixa dose infectante pode ser atribuída ao fato de *Shigella* spp. sobreviver com sucesso à acidez do estômago do hospedeiro, provavelmente devido à expressão de genes de resistência a ácidos (Small *et al.*, 1994).

O microrganismo *Shigella* spp. é capaz de invadir o epitélio do cólon intestinal, penetrando através das células M, e em seguida causar a morte por apoptose de macrófagos adjacentes (Sansoneetti *et al.*, 1996; Wassef, *et al.*, 1989; Zychlinsky *et al.*, 1994). Os macrófagos infectados liberam uma alta dose de interleucina-1 β , o que leva a uma forte resposta inflamatória. Enquanto isso, bactérias liberadas pelos macrófagos rompidos são capazes de invadir basolateralmente os enterócitos adjacentes, e, por conseguinte, passar de uma célula para outra, espalhando a infecção pelo trato intestinal do hospedeiro. As citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células epiteliais em resposta à

infecção pelo patógeno causam a inflamação local do cólon intestinal, o que resulta em sangramento e acúmulo de muco encontrado nas fezes destes pacientes (Suzuki & Sasakawa, 2001).

Apesar da disenteria ser uma inflamação localizada, em alguns casos, dependendo da virulência da bactéria e do estado nutricional e imunológico do paciente, ela pode evoluir para um quadro clínico mais drástico. Entre 3 a 50% dos casos (Salyers, 1994), essa infecção inicial pode ser seguida de complicação neurológica, letargia, cefaléia e convulsões, ou até mesmo de insuficiência renal (síndrome hemolítica urêmica - SHU). Todos esses sintomas secundários parecem ocorrer principalmente devido a lesões nos vasos sangüíneos causadas por moléculas produzidas pelas próprias bactérias que estejam circulando como, por exemplo, o LPS (lipopolissacarídeos) ou a toxina Shiga, que é produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo I (Salyers & Whitt, 1994).

Antibióticos podem ser usados para o tratamento das infecções causadas por *Shigella* spp., diminuindo, desta forma, o período em que o paciente passa excretando fezes contaminadas no ambiente, reduzindo assim a disseminação do patógeno (Jennison & Verma, 2004). Entretanto, antibioticoterapia excessiva vem colaborando com o surgimento de cepas multirresistentes, um importante agravante na tentativa de se controlar a shigelose.

O bacilo foi primeiramente isolado em 1888 por Chantemesse e Widel, e detalhadamente estudado por Kiyoshi Shiga em 1898 (revisado por Lan & Reeves, 2002), sendo primeiramente denominado *Bacillus dysenteriae*. Entretanto, *Shigella* spp. só teve seus biotipos e sorogrupos extensivamente estudados, e seus quatro subgrupos (ou “espécies”) definidos por volta de

1940, sendo colocados em um grupo taxonômico distinto de *E. coli* por apresentar uma importância médica relevante (Lan & Reeves, 2002). As “espécies” reconhecidas são: *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*, que correspondem aos subgrupos A, B, C e D, respectivamente, como haviam sido denominados no início do século. *S. flexneri* é a “espécie” predominante em áreas endêmicas, responsável por aproximadamente 50% dos casos. *S. dysenteriae* responde por 30% dos casos infecciosos e é uma das principais responsáveis por epidemias em países subdesenvolvidos (Bennish *et al*, 1990). Casos de infecções por *S. sonnei* são mais frequentes em países industrializados (Murray, 1998), sendo *S. boydii* isolada raramente em casos esporádicos.

Relativamente poucas propriedades bioquímicas são utilizadas para a distinção entre as espécies, como por exemplo, utilização de manitol, descarboxilação da ornitina e produção de indol. Geralmente a sorotipagem é eficiente em distinguir as “espécies”. São reconhecidos 46 sorotipos em *Shigella* spp., todos caracterizados pelo antígeno O de parede, codificado geralmente por genes cromossômicos (Shears, 1996). *S. dysenteriae* compreendem 13 sorotipos, *S. flexneri* 6 sorotipos, alguns sendo divididos em subtipos, e *S. boydii* 18 sorotipos. *S. sonnei* possui apenas um sorotipo (Shears, 1996). Entretanto, de acordo com as regras de sorotipagem utilizadas para *S. enterica* e *E. coli* atuais, são considerados 33 sorotipos em *Shigella* spp. Tal fato ocorre principalmente porque muitas variantes são frutos de conversões de fagos, que normalmente não são elevados ao status de sorotipo (Lan & Reeves, 2002).

A divisão do gênero em quatro “espécies” distintas começou a ser discutida a partir de 1974 com a publicação de trabalhos mostrando certa

dificuldade em se distinguir fenotipicamente *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. Apesar de possuírem antígenos específicos, algumas reações cruzadas entre os soros utilizados em sua identificação ocorrem com frequência, assim como ocorrem reações cruzadas entre soros de *Shigella* spp. e *E. coli* (Dodd & Jones, 1982). Em 1982, Dodd e Jones utilizaram 102 linhagens de *Shigella* spp. para determinar as relações fenotípicas entre elas com base em 192 caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, por taxonomia numérica. Como resultado, obtiveram um dendrograma onde *Shigella* spp. formava um cluster distinto de *E. coli*, porém mais relacionado com *Yersinia* e *Proteus/Providencia*. A formação deste cluster fomentou a idéia de que *Shigella* spp. poderia ser separada em um gênero distinto de *E. coli*.

A partir de 1944 foram isoladas algumas formas patogênicas de *E. coli*, como por exemplo, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC) e enteroinvasiva (EIEC), sugerindo aos pesquisadores que poderia existir um grau de similaridade ainda maior entre as “espécies” de *Shigella* spp. e essas novas formas patogênicas (patovares ou patogrupos) de *E. coli* que estavam sendo descobertas. Através de várias comparações bioquímicas (Farmer *et al.*, 1991, Lan & Reeves, 2002) chegou-se à conclusão que EIEC seria o subgrupo de *E. coli* que continha as características mais semelhantes ao “gênero” *Shigella* spp., sendo a “espécie” *S. sonnei* a mais distinta dentre o gênero todo. É interessante notar a característica única e clonal de *S. sonnei* no sentido de ter um único sorotipo, ao contrário das outras três “espécies” de *Shigella* spp., o que poderia ser reflexo desse distanciamento da mesma dentro do grupo.

Recentemente, através de experimentos de hibridação de DNA (Brenner *et al.*, 1972, 1973, 1974), MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) (Ochman

et al., 1983), ribotipagem (Rolland, 1998), e uma combinação de MLEE e sequenciamento do gene *mdh* (Pupo *et al.*, 1997 e 2000), sugeriu-se que linhagens de *Shigella* spp. encontram-se agrupadas com *E. coli*, fazendo parte de dois dos principais “clusters” que formam o grupo *E. coli*, que é composta pelos grupos A, B1, B2 e D. Dessa forma, postulou-se que não teria existido um único clone ancestral de *Shigella* spp., mas sim que as “espécies” de *Shigella* seriam derivadas de diferentes ancestrais de linhagens de *E. coli* (Rolland *et al.*, 1998). Ainda baseado nestes estudos, propôs-se que o gênero fosse composto por uma única espécie que também compreenderia *E. coli*. Isso quer dizer que *Shigella* spp., na verdade, deveria ser considerada como parte do gênero *Escherichia* spp., e não um gênero à parte propriamente dito. Essas comparações ganharam força recentemente com o seqüenciamento completo de duas linhagens de *S. flexneri* por dois grupos distintos de pesquisadores (Jin *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003), permitindo comparar detalhadamente o genoma completo de *Shigella flexneri* com a linhagem de *E. coli* não patogênica K12 e a linhagem patogênica O157:H7, chegando a conclusão que *S. flexneri* seria mais relacionada com *E. coli* K12 do que a própria O157:H7 em relação à K12.

Entretanto, ainda hoje é comum referir-se ao microrganismo *Shigella* spp. como um gênero distinto de *E. coli*. Essa divisão, no entanto, é apenas didática e histórica, e é comum referir-se a elas utilizando a palavra espécie entre aspas (“espécies”), sem a necessidade de se grafar o nome científico em itálico ou sublinhado, a não ser quando inseridas em um contexto histórico (Lan & Reeves, 2002). No presente trabalho será adotada a nomenclatura mais utilizada atualmente nos trabalhos científicos, permanecendo o termo “espécie” para os quatro grupos de *Shigella* spp.

1.2– Patogenicidade

A shigelose é caracterizada por cólicas abdominais, diarreia, febre, e fezes sanguinolentas que aparecem após um curto período de incubação de aproximadamente três dias. O principal mecanismo de patogenicidade de *Shigella* spp. é a capacidade de invadir células epiteliais do cólon do intestino através da fagocitose induzida provocada pela formação de polímeros de actina na célula hospedeira na região de contato com a célula bacteriana (Goldberg & Sansonetti, 1993). Essa invasão destrói as células epiteliais, causando os sintomas citados acima. A infecção geralmente é restrita à região superficial da mucosa intestinal, causando uma grave lesão no tecido, originando abscessos e ulcerações.

O microrganismo não é capaz de invadir as células epiteliais pela região apical, conforme foi evidenciado por Mounier *et al.* (1992), por meio de estudos com células intestinais humanas da linhagem Caco-2 ou T84 polarizadas, as quais, ao contrário das usuais células HeLa ou Hep-2, apresentam uma diferenciação entre as regiões apical e baso-lateral, semelhante ao que é encontrado no epitélio intestinal *in vivo*. Dessa forma, uma rota alternativa foi descoberta, indicando que as bactérias colonizavam as células epiteliais do intestino humano através da face basolateral.

O acesso a essa região do enterócito se dá primeiramente através das células M intestinais (Sansonetti & Phalipon, 1999). As células M são células epiteliais modificadas, com alta atividade endocítica, que atuam transportando antígenos solúveis e particulados do lúmen intestinal para as células apresentadoras de antígenos na camada basal do folículo. Elas são encontradas na região do epitélio folicular, que se encontram próximas aos nódulos linfáticos. Essas estruturas linfóides se encontram espalhadas pelo

intestino de mamíferos em agregados denominados placas de Peyer. As células M são relativamente raras, compondo menos de 0,1% das células epiteliais (Philpott *et al.*, 2000). Entretanto, assim como *Shigella* spp., outros patógenos intestinais, como *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. adotaram também essa rota de entrada, o que poderia levar a indagar como essas células tão raras teriam sido evolutivamente selecionadas como o alvo para a entrada desses diferentes organismos no epitélio intestinal humano. Acredita-se que tal fato ocorra devido à falta de muco e glicocálice na região folicular próxima às células M, facilitando uma interação não-específica entre o patógeno e a célula M. Além disso, as células M expressam moléculas características de superfície, que poderiam ter sido selecionadas evolutivamente como possíveis receptores para esses microrganismos (Philpott *et al.*, 2000).

Após atravessarem a camada epitelial através das células M, as bactérias são fagocitadas pelos macrófagos que se encontram na camada sub-epitelial. Entretanto, ao invés de destruírem as bactérias nos fagossomos, os macrófagos sofrem apoptose (Zychlinsky *et al.*, 1992). Acredita-se que o produto do gene plasmidial IpaB de *Shigella* spp. seja o responsável por mediar a liberação das bactérias do fagossomo. Uma vez livre no citoplasma do fagossomo, a bactéria libera a proteína IpaB no citosol do macrófago, a qual se liga a caspase-1, ativando-a (Figura 1.1). Ao contrário da maioria das reações de apoptose, a morte celular ativada pela caspase-1 é acompanhada de uma grave inflamação, devido ao fato dela ativar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Zychlinsky *et al.*, 1994). Essas citocinas pró-inflamatórias atraem as células polimorfonucleares que se infiltram na região infectada, desestabilizando o epitélio, causando a formação de ulcerações e abscessos na mucosa intestinal, liberando sangue, leucócitos e muco para a luz do

intestino, levando ao quadro de disenteria (Hale, 1991). Dessa forma, ocorre uma perda na integridade da barreira epitelial, permitindo que mais bactérias invadam a região sub-epitelial por uma via independente das células M, e ainda, que bactérias liberadas pelos macrófagos que sofreram apoptose possam invadir as células epiteliais basolateralmente. Dentro dessas células as bactérias se locomovem através da polimerização de actina, se multiplicam e se espalham pelo epitélio intestinal de célula a célula.

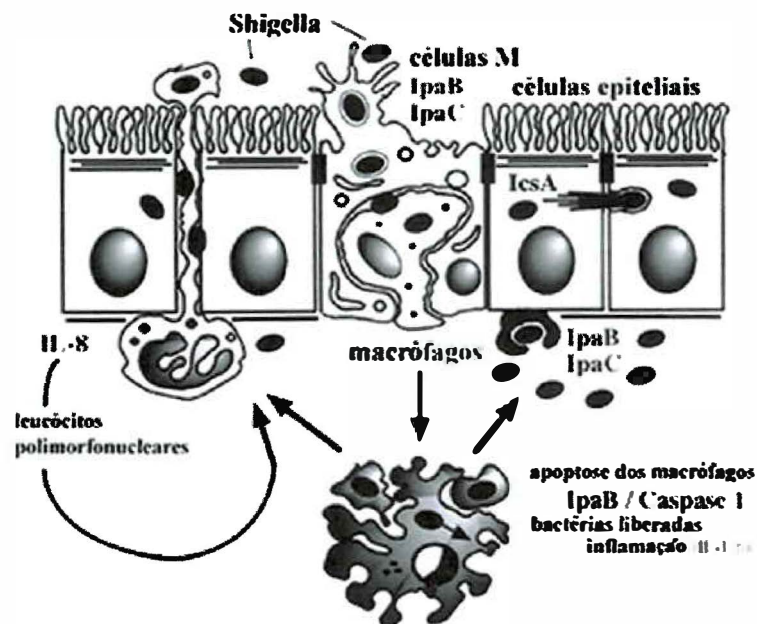


FIGURA 1.1: *Shigella* spp. atravessando a barreira epitelial através das células M seguida pela apoptose de macrófagos e “invasão” das células endoteliais através da superfície basolateral (modificado de Sansonetti & Phalipon, 1999).

O cromossomo de *Shigella* spp. apresenta aproximadamente 4.600.000 pares de base (Wei *et al.*, 2003) e apresenta pelo menos três ilhas de patogenicidade, que codificam fatores de virulência como, por exemplo, o LPS e genes dependentes de temperatura que regulam a expressão de genes plasmidiais (Jennison & Verma, 2004). No entanto, a maior parte dos fatores de

virulência de *Shigella* spp. é codificada por genes encontrados em um fragmento de 31kb em um plasmídeo de alto peso molecular (220kb), (Sansonetti *et al*, 1981), presente no citoplasma das células bacterianas e conhecido como plasmídeo de virulência. Essa seqüência, conhecida como “região de invasão”, é composta por dois *loci* gênicos distintos que codificam proteínas associadas com a invasão de células eucarióticas, com função de induzir uma reestruturação do citoesqueleto celular na região de contato com a célula bacteriana (Maurelli *et al*, 1985; Sasakawa *et al*, 1988).

Um dos *loci* é composto pelo operon *ipa*, com os genes que codificam as proteínas responsáveis pela invasão. Essas proteínas estão basicamente relacionadas com a ativação da polimerização de monômeros de actina. Foram identificados cinco quadros de leitura (*open reading frames*) nessa região, que codificam as proteínas IpgC, IpaB, IpaC, IpaD, e IpaA, cujas iniciais significam “antígenos protéicos de invasão”. Foi demonstrado por Sasakawa *et al* (1989), que bactérias mutantes para os genes IpaB, IpaC e IpaD são incapazes de ativar a mobilização de proteínas do citoesqueleto da célula hospedeira, sendo, portanto, incapazes de desencadear um quadro infeccioso. Porém, mutantes IpaA mantêm a virulência e a capacidade de invadir células eucarióticas (Ménard *et al*, 1993). Foi verificado também que as proteínas Ipa são secretadas somente após a ingestão da bactéria pelo organismo hospedeiro, pois os genes de virulência de *Shigella* spp. são expressos a 37°C e não a 30°C, fazendo com que as proteínas de virulência só sejam expressas quando no interior de organismos hospedeiros, e não no ambiente (Dorman, 1995). O gene IpgC, situado no mesmo operon, codifica uma proteína de 17KDa (Ménard *et al*, 1994) que impede a associação de IpaB e IpaC no citoplasma bacteriano. Essa proteína é considerada uma *chaperone*, pois assiste à

montagem de IpaB e impede a associação precoce dessa com IpaC (revisado por Brocchi *et al.*, 1998).

Além do *locus ipa*, outro *locus* também encontrado no plasmídeo de alto peso molecular parece estar relacionado com a capacidade de invadir células epiteliais. Esse *locus* é formado por aproximadamente 20 genes denominados *mxi* (*membrane expression of ipa*) e *spa* (*surface presentation antigen*), formando um *cluster* que é dividido em dois operons (revisado por Brocchi *et al.*, 1998). Os genes *mxi/spa* codificam a maquinaria de secreção do tipo III, um sistema evolutivamente conservado em bactérias, que em *Shigella* spp. é responsável pela secreção das proteínas Ipa no citoplasma da célula hospedeira (Sasakawa *et al.*, 1988). As proteínas Ipa são sintetizadas e armazenadas no interior da célula bacteriana e são secretadas pelo sistema de secreção tipo III quando em contato com a célula hospedeira. A associação entre IpaB e IpaD forma um complexo, e acredita-se que ele seja responsável pelo fluxo das proteínas Ipa através do sistema de secreção (Ménard *et al.*, 1996). Assim que são secretadas, as proteínas IpaB e IpaC, que são hidrofóbicas, se dirigem à membrana da célula hospedeira, formando um complexo na forma de poro que interage com a membrana da célula epitelial, fazendo com que as outras proteínas Ipa penetrem na célula hospedeira. Dentro da célula hospedeira, as proteínas IpaA, IpaC e IpgD promovem um rearranjo do citoesqueleto, principalmente da actina, provocando a formação de pseudópodes que engolfam a bactéria trazendo-a para o interior da célula hospedeira em uma vesícula macropinocítica. Desta forma, o termo “invasão” parece não ser apropriado para o fato descrito acima. Como invasão se refere a uma penetração ativa da bactéria na célula hospedeira, esse processo seria melhor denominado “fagocitose induzida” (Salyers, 1994). Entretanto, devido

ao uso da palavra “invasão” na maioria dos trabalhos, continuaremos adotando este termo no decorrer do presente trabalho.

Já foram encontrados alguns receptores de adesão celular eucarióticos que seriam possíveis ligantes para IpaB-C e D, como por exemplo a integrina $\alpha 5\beta 1$, localizada na região basolateral das células epiteliais do intestino humano, e CD44, o receptor de hialurona, um componente da matriz extracelular que também é expresso na região basolateral (Philpott *et al.*, 2000). Entretanto, esses receptores ainda não foram comprovados em testes *in vivo*, e ainda não foi isolada nenhuma adesina de *Shigella* spp. que poderia servir como molécula ligante destes receptores, o que levanta a questão de que a adesão seria ou não um processo importante para a invasão do epitélio intestinal. Para reforçar ainda mais essa questão, é verificado que *Shigella* spp. é capaz de invadir células de diferentes espécies em testes laboratoriais (HeLa, camundongos, macaco, porquinho da Índia), argumentando com a existência de uma possível interação espécie-específica necessária para a invasão (Philpott *et al.*, 2000).

Após a liberação das bactérias dos macrófagos na região sub-epitelial, ocorre a invasão da célula epitelial pela região basolateral. Após a invasão da célula hospedeira por fagocitose, a membrana do fagossomo é lisada através da ação das proteínas IpaB, fazendo com que a bactéria seja liberada no citoplasma, onde se multiplica rapidamente (High *et al.*, 1992). Em seguida, filamentos de actina se acumulam em um dos pólos da célula bacteriana (Figura 1.2a). Esses filamentos se agrupam formando uma cauda filamentosa que auxilia na locomoção da bactéria no interior do citoplasma da célula hospedeira em direção oposta ao pólo onde a cauda foi formada.

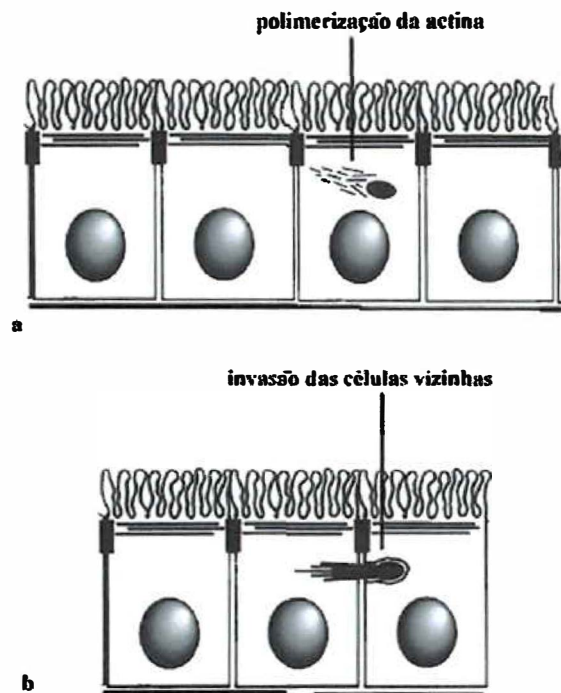


FIGURA 1.2: a) Formação da cauda de actina em *Shigella* spp. e b) invasão das células epiteliais adjacentes (modificado de Sansonetti & Phalipon, 1999).

A formação dessa cauda se dá por um processo que envolve a formação de polímeros de actina e plasmína, outra proteína do citoesqueleto eucariótico, formando uma estrutura contrátil que dá força propulsora para a bactéria se locomover no interior da célula do hospedeiro (revisado por Brocchi *et al*, 1998). A indução da formação da cauda se dá pelo gene plasmidial *icsA* (*VirG*), sendo que a proteína *IcsA* também estaria relacionada com a hidrólise de ATP, necessário para a liberação de energia consumida nesse processo. A proteína *IcsA* ou *VirG* é uma proteína de superfície celular associada ao LPS que é encontrada expressa somente em um dos pólos da célula bacteriana, permitindo que a polimerização da actina ocorra também de forma polarizada. Essa proteína promove a polimerização da actina através da interação de *IcsA* (*VirG*) com a proteína da síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP) e com vinculina, proteínas presentes no citoplasma dos enterócitos. Tal fato promove

a polimerização da actina pela interação com o complexo de proteínas relacionadas com actina - Arp 2/3 (Suzuki & Sasakawa, 2001).

Em seguida, a célula bacteriana, por intermédio das proteínas IpaB e IpaC, rompe a vesícula macropinocítica e, livre no citoplasma, se divide e locomove-se no interior da célula hospedeira com o auxílio da cauda filamentosa de actina. Nesse momento ocorre a necrose das células hospedeiras causada pela liberação de citocinas fruto da resposta inflamatória (Jennison & Verma, 2004). Quando atinge a membrana da célula endocítica, a bactéria provoca uma evaginação na célula em direção à célula epitelial adjacente (Figura 1.2b). Após a formação da evaginação, ocorre a lise dessa dupla membrana (membrana da célula em que a bactéria estava mais a membrana da célula adjacente), e liberação da bactéria no interior da nova célula epitelial (revisado por Brocchi *et al*, 1998). Nesse processo também parece estar envolvido o gene *lcsB* (Allaoui *et al*, 1992). Além da proteína IcsB, E-caderina, presente na célula eucariótica e um importante componente da adesão intercelular, parece ser necessária para essa passagem da bactéria de uma célula para outra. Tal fato foi evidenciado por Sansonetti *et al*. (1994), em um experimento que mostrava que células que não expressavam caderinas eram ineficientes em transmitir a bactéria de uma célula para outra.

As “espécies” de *Shigella* spp são ainda capazes de produzir citotoxinas ao penetrarem e proliferarem no interior das células do íleo terminal (Sears e Kapper, 1996). Essas citotoxinas são responsáveis pela inibição da síntese protéica e morte celular e pelo distúrbio hidrossalino responsável pela fase diarreica da infecção. *S. dysenteriae* é a única “espécie” capaz de produzir, além de altos níveis de citotoxina, uma potente exotoxina, com semelhança estrutural à toxina colérica (*Vibrio cholerae*), denominada toxina Shiga, que,

além de agravar o quadro inflamatório (Sears e Kapper, 1996), apresenta ação neuroenterópica (Bier, 1984) e causa a síndrome hemolítica urêmica (SHU), provocando insuficiência renal (Salyers, 1994). Essa toxina é codificada por um operon cromossômico (*stxA* e *stxB*) e tem a capacidade de interromper a síntese protéica da célula hospedeira, inativando a subunidade 60S dos ribossomos eucarióticos sem afetar a estrutura ribossômica bacteriana.

1.3- Tipagem de microrganismos

Dentro de uma mesma espécie, alguns indivíduos são mais relacionados com outros e, conseqüentemente, distintos de um outro grupo. Apesar de pertencerem à mesma espécie, compartilham fatores de virulência, características bioquímicas e genéticas, existe uma diversidade tão grande dentro do grupo, que indivíduos isolados em locais ou momentos distintos podem ser diferenciados e classificados em linhagens distintas através da tipagem (Olive & Bean, 1999). Portanto, a tipagem (ou subtipagem) de microrganismos é utilizada na tentativa de se caracterizar um microrganismo abaixo do nível taxonômico de espécie.

Os métodos de tipagem de microrganismos requerem uma série de critérios para que possam ser utilizados em larga escala. Em primeiro lugar, esses métodos devem ter um alto grau de diferenciação, permitindo diferenciar amostras bacterianas não relacionadas e ao mesmo tempo demonstrar a relação de similaridade que existe entre amostras de mesma origem clonal (Olive & Bean, 1999). Outro critério que se deve ter sempre em mente durante a realização de uma tipagem é que os métodos utilizados devem ser altamente reprodutíveis, ou seja, deve-se obter o mesmo resultado toda a vez que uma determinada linhagem é testada. É por isso que fatores de virulência que têm

sua expressão variada não são eficientes como alvo de anticorpos para a caracterização de subtipos bacterianos (Olive & Bean, 1999). Além disso, todos os microrganismos de uma espécie devem ser possíveis de serem tipados pelo método em questão.

A tipagem é muito importante para estudos epidemiológicos, por exemplo. Em estudos de epidemiologia, os microrganismos envolvidos em um surto podem ter uma relação clonal muito forte entre si, ou seja, podem ter tido uma origem comum. A detecção desta origem comum, por sua vez, pode ser de extrema importância na detecção da fonte da epidemia, e por consequência, importante na erradicação da doença, prevenção e tratamento dos pacientes contaminados. Além disso, a tipagem é importante no estudo de transmissão de infecções hospitalares, detectando-se possíveis focos de origem e reconhecendo possíveis cepas virulentas e multirresistentes.

A tipagem de microrganismos pode ser baseada tanto no fenótipo como no genótipo dos organismos estudados. Tradicionalmente, a identificação dos microrganismos requeria métodos relativamente lentos, baseados em características fenotípicas, microbiológicas e bioquímicas como, por exemplo, através da análise de resistência a antibióticos, sorotipagem, fagotipagem, e comparação de isoenzimas. Entretanto, a maior parte destes métodos convencionais de tipagem apresenta alguns problemas em relação à sua aplicação em larga escala (Tsang *et al.*, 1992 e Bingen *et al.*, 1994). Por exemplo, a sorotipagem baseia-se na presença ou não de determinados antígenos de superfície na bactéria, detectados através de anti-soros específicos em uma reação de aglutinação. Esses sorotipos só podem ser definidos se o antígeno em questão estiver presente na bactéria estudada. Muitas vezes nem todas as linhagens de uma determinada espécie apresentam

esses antígenos, fazendo com que o grupo todo não possa ser tipado por esse método em particular. Por exemplo, de 10 a 15% das linhagens de *Mycobacterium avium* são não tipáveis, pois não reagem com os anticorpos disponíveis para sorotipagem atuais (Tsang *et al.*, 1992). Além disso, a sorotipagem requer uma coleção muito grande de anticorpos que pode acarretar custos elevados para sua obtenção, isolamento e estocagem, além da necessidade de existir linhagens padrões muito bem caracterizadas de cada sorotipo (Bingen *et al.*, 1994).

A fagotipagem baseia-se na presença ou ausência de um determinado receptor para determinados bacteriófagos. Mais uma vez, nem sempre todas as linhagens de uma espécie apresentam os receptores para os vírus em questão, como foi verificado na fagotipagem de *Staphylococcus aureus*, na qual algumas linhagens não possuíam o receptor para o fago e, por sua vez, não podiam ser infectadas pelo mesmo (Olive & Bean, 1999). Tal fato torna essa metodologia restrita a algumas linhagens, condição essa imprópria para a aplicação em larga escala.

Atualmente, estudos baseados em tipagem molecular estão sendo amplamente empregados nos mais variados aspectos da análise de isolados bacterianos, utilizando-se marcadores de DNA, tais como seqüências repetitivas ou aleatórias do genoma bacteriano amplificadas por PCR, hibridação do DNA com oligonucleotídeos e “fingerprinting” utilizando-se endonucleases de restrição, para citar alguns exemplos. Todos esses métodos se baseiam na análise do perfil de fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares separados em um gel de agarose. A premissa básica de todos esses métodos reside no fato de que amostras bacterianas relacionadas epidemiologicamente apresentam um precursor comum (clone). Tais estudos

permitem uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos com a evolução da virulência, o surgimento e a prevalência de potenciais patógenos e a identificação de fontes comuns de infecção. Além disso, por serem baseados em informações presentes no genoma das linhagens, essa metodologia está livre da variação fenotípica que mascararia a tipagem microbiana convencional.

1.3.1 - Ribotipagem

A descoberta das enzimas de restrição (endonucleases) foi peça chave no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, e veio auxiliar muito as técnicas de tipagem molecular de microrganismos. As enzimas de restrição são produzidas naturalmente por algumas bactérias e são responsáveis por digerir material genético exógeno que poderia estar invadindo esse organismo como, por exemplo, em infecções por bacteriófagos, protegendo dessa maneira, a célula bacteriana. O sítio de reconhecimento deste tipo de enzima é uma seqüência específica de DNA dupla fita de quatro a seis pares de base, que consiste normalmente de uma seqüência palindrômica, ou seja, ela tem um eixo de simetria e a seqüência de bases de uma fita é igual à da fita complementar, quando lida na direção oposta.

Essas enzimas clivam o DNA em lugares específicos, gerando fragmentos que podem ser visualizados como diferentes bandas através de eletroforese em um gel de agarose, podendo, dessa forma, ser usadas para se determinar o padrão de polimorfismo entre várias amostras de DNA de indivíduos diferentes. Um fator importante é que essas enzimas clivam o DNA em um número definido de vezes em cada organismo, gerando um padrão específico de fragmentação, ou seja, cada enzima de restrição dá origem a uma família única de fragmentos quando cliva uma molécula de DNA

específica. O polimorfismo gerado dessa forma é denominado RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou seja, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

Em muitos casos, o padrão de bandas de RFLP obtido é muito complexo e difícil de se analisar devido à grande quantidade de bandas, sendo difícil de se observar em um gel de agarose comum. Nesses casos, pode-se recorrer a uma técnica de eletroforese denominada eletroforese de campo pulsado (PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), na qual as amostras bacterianas a serem digeridas pela enzima de restrição são colocadas em pequenos “plugs” de agarose, e a corrida eletroforética é feita em um gel exposto a uma corrente elétrica que pulsa em diferentes sentidos, fazendo com que grandes fragmentos de DNA possam migrar pelo gel e permitir uma fácil visualização do padrão de bandas obtido. Como a técnica do PFGE é muito trabalhosa, demanda um maior tempo para ser realizada e tem um custo elevado, pode-se optar em restringir o padrão de bandas gerado pela digestão do DNA bacteriano por enzimas de restrição, utilizando-se sondas específicas que hibridarão com algumas destas bandas. Dessa forma, obtém-se um padrão de bandas mais restrito, permitindo uma melhor análise dos resultados, sem mascarar o polimorfismo existente na população bacteriana testada.

Na Ribotipagem, um tipo específico de RFLP é gerado (Grimont & Grimont, 1986). Através deste método, após digerir o DNA com a enzima de restrição, faz-se a hibridação desses fragmentos com sondas de DNA ribossômicos, gerando um padrão de bandas específico mais restrito. No genoma bacteriano, os genes que codificam os RNA ribossômicos 5S, 16S e 23S estão organizados em operons que se encontram espalhados pelo cromossomo bacteriano um número repetido de vezes. *Shigella* spp. possui

sete operons de rRNA (Jin *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003). Essa quantidade variável de operons por genoma é crucial para o processo de ribotipagem, pois quanto maior o número dessas seqüências, maior será o seu poder discriminatório, pois será gerado um maior padrão de bandas, que por sua vez permitirá uma análise mais detalhada do RFLP existente na população estudada (Bingen *et al.*, 1994 & Jin *et al.*, 2002).

Os genes de rRNA são essenciais para a biologia das bactérias, o que o torna um importante alvo no emprego de sondas de DNA para finalidades de tipagem. Dessa forma, todas as amostras de uma determinada espécie bacteriana poderão ser tipadas por este método, pois todas terão o gene alvo em seu genoma. Por esses genes estarem contidos no genoma e serem essenciais para a bactéria, não existe o risco da perda desta característica, (Hinojosa-Ahumada *et al.*, 1991). As seqüências de nucleotídeos destes genes sofreram poucas modificações ao longo do processo evolutivo, existindo uma conservação dessas seqüências entre as diferentes espécies de bactérias. Portanto, é possível utilizar uma sonda universal para esse operon que possa ser utilizada em diferentes análises para bactérias distintas (Bingen *et al.*, 1994). Além disso, as seqüências espaçadoras e aquelas que flanqueiam os genes 5S, 16S e 23S no operon apresentam uma heterogeneidade muito grande entre as diferentes espécies bacterianas como, por exemplo, uma região heterogênea composta de alguns genes de tRNA (Bacot & Reeves, 1991) em *E. coli*, permitindo que uma grande variedade de padrões de fragmentos de restrição seja gerada. Os diferentes RFLP gerados são frutos das diferenças existentes nessas seqüências de nucleotídeos das regiões entre os genes dos operons e seqüências flanqueadoras, detectadas pela digestão com enzimas de restrição. Além disso, os padrões de rDNA não estão sujeitos

à pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, o que torna a ribotipagem um método muito confiável em termos de reprodutibilidade.

Tal fato revela que a técnica de ribotipagem é eficiente no reconhecimento da sonda com o padrão de RFLP gerado devido à conservação existente nas seqüências de rDNA, ao mesmo tempo em que permite um detalhado e variado padrão de polimorfismo, devido à heterogeneidade das regiões existentes entre os genes do operon.

1.3.2 – PCR de seqüências repetitivas (Rep-PCR)

Praticamente todos os seres vivos, eucariotos e procariotos, apresentam seqüências de DNA repetitivas espalhadas em seu material genético. Essas seqüências variam muito em seu tamanho e em número de cópias por genoma, e ainda não se conhece por completo a real função de muitas dessas seqüências conservadas no que diz respeito a sua importância para o correto funcionamento do DNA em sua maquinaria de síntese e transcrição. A seqüência repetitiva mais bem caracterizada em eucariotos é a seqüência *Alu*, de 300 pares de bases em mamíferos, com cerca de 300.000 cópias distribuídas por genoma haplóide em humanos (Schmid & Jelinek, 1982).

O genoma dos organismos procariotos é geralmente menor que o de organismos eucariotos, tendo seu reduzido tamanho sido mantido através de seleção natural, no sentido em que possibilita uma rápida replicação do DNA e conseqüente divisão celular (Versalovic *et al.*, 1991). O genoma desses organismos também é intercalado por várias seqüências repetitivas diferentes, entremeadas por genes de cópia única e operons. Muitas destas seqüências têm um número de cópias reduzidas e funções conhecidas, como as seqüências de operons de rRNA, que codificam os RNA ribossômicos 5S, 16S

e 23S; e ainda as seqüências de genes de tRNA, que codificam os RNA transportadores bacterianos. Além dessas seqüências, existem algumas seqüências relativamente menores, não codificantes, e com um número ainda mais elevado de cópias. Essas seqüências estão presentes em diferentes posições do genoma bacteriano, e esse DNA não codificante e repetitivo provavelmente é mantido sob ação da seleção natural devido ao seu caráter de replicação rápida, apresentando características de seqüências de “DNAs egoístas”, ou seja, seqüências sem valor adaptativo que são selecionadas devido a sua proximidade a genes importantes e de alto valor adaptativo.

A primeira seqüência repetitiva bacteriana a ser descrita, e uma das mais bem estudadas, é a unidade palindrômica (PU - *Palindromic Units*), também conhecida como palíndromo repetitivo extragênico (REP - *Repetitive Extragenic Palindrome*). A seqüência REP é uma seqüência palindrômica de 38 nucleotídeos com uma região variável central de 5pb flanqueada por duas ramificações complementares entre si, que podem formar um alça altamente estável (Stern *et al.*, 1984). Essas seqüências são geralmente encontradas repetidas vezes por todo o genoma bacteriano, inseridas em regiões entre os genes, dentro ou fora de operons, formando clusters, com cerca de 563 seqüências em 295 “clusters” espalhadas pelo genoma de bactérias como *E. coli*, por exemplo (Dimri *et al.*, 1992).

As seqüências REP foram inicialmente descritas em *Salmonella typhimurium* e *E. coli*, mas já foram detectadas seqüências consenso em praticamente todas as eubactérias, demonstrando seu caráter conservado que poderia estar relacionado com alguma função importante para o genoma bacteriano (Lupski & Weinstock, 1992). Algumas funções foram propostas para essas seqüências, como a de regulação da expressão gênica por meio de

tradução diferencial em operons policistrônicos e estabilização de mRNA (Newbury *et al.*, 1987 e 1987a), sugeridas devido à conformação estrutural na forma de alça com *loop* dessas seqüências REP. Porém, esses elementos não estão sempre presentes nas mesmas posições intergênicas entre diferentes espécies de organismos, sugerindo que elas não sejam essenciais para o processo de expressão gênica. Tal processo provavelmente seria uma função secundária dessas seqüências. Corroborando com esta idéia, DNA girase (Yang *et al.*, 1988) e DNA polimerase I (Gilson *et al.*, 1990) foram encontradas se ligando a seqüências REP, sugerindo um possível papel estrutural para essas seqüências, as quais poderiam exercer um papel importante no dobramento do nucleóide bacteriano em domínios de super enovelamento (Lupski & Weinstock, 1992). Foi descrito também que seqüências REP adjacentes inseridas em seqüências repetitivas mosaico (BIMes) poderiam servir de sítio de ligação para o fator de integração ao hospedeiro (IHF – *Integration Host Factor*) de *E. coli*. IHF, por sua vez, auxiliaria na ligação e modulação da atividade da proteína DNA girase, auxiliando no desenovelamento da dupla fita de DNA durante o processo de transcrição (Boccard & Prentki, 1993).

Outra seqüência repetitiva encontrada em genomas de organismos da família *Enterobacteriaceae* é a unidade repetitiva intergênica (IRU – *Intergenic Repeat Unit*), mais conhecida como consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (Sharples & Lloyd, 1990). Essa seqüência palindrômica de aproximadamente 127 nucleotídeos é também localizada em regiões não codificantes do genoma bacteriano, ou seja, situa-se entre genes transcritos dentro ou fora de operons, com sua posição variando em relação à posição das seqüências de terminação

e promotoras dos genes, fazendo com que apenas uma pequena parte destas seqüências ERIC sejam transcritas na forma de RNA (Sharples & Lloyd, 1990). Quando a seqüência ERIC se encontra antes de uma seqüência de terminação de um determinado gene, ela é transcrita junto com o gene que a acompanha. Dessa forma, a parte do mRNA correspondente às seqüências ERIC formariam uma estrutura na forma de alça (devido à complementaridade entre algumas seqüências invertidas), a qual poderia interferir com a ligação do mRNA aos ribossomos, influenciando na tradução do mesmo, sugerindo, desta maneira, uma função regulatória para os elementos ERIC (Sharples & Lloyd, 1990). As seqüências ERIC poderiam ainda proteger a região 3' do mRNA contra digestão por exonucleases, assim como foi também proposto para as seqüências REP, e dessa forma aumentar a expressão de genes que estejam a montante dessas seqüências. Ainda não foi descrita nenhuma proteína que poderia se ligar às seqüências ERIC, tal como foi descrito para REP. Porém, devido à natureza conservada deste elemento em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, sugere-se que ele possa designar um sinal estrutural para o DNA destes microrganismos (Sharples & Lloyd, 1990).

A seqüência consenso ERIC não parece estar relacionada com os elementos REP, e ainda não se sabe claramente os mecanismos de herança desses elementos. Eles não são relacionados a nenhuma outra seqüência repetitiva conhecida como, por exemplo, seqüências de inserção, transposons ou genes estruturais de RNA, e, além disso, são muito pequenos para poderem codificar uma transposase que poderia mediar sua transposição (Sharples & Lloyd, 1990). Entretanto, essas seqüências poderiam ser resquícios de elementos transponíveis, o que poderia sugerir sua origem em comum para vários representantes de eubactérias. Como essas seqüências já foram

encontradas em representantes tanto do domínio das eubactérias como em archeobactérias (*Halobacterium halobium*), sugere-se que a origem desses elementos seja anterior ao surgimento da linhagem de bactérias Gram-negativas entéricas. No entanto, algumas espécies distantes, tais como *Deinococcus radiophilus*, *Herpetosiphon giganteus* e até mesmo a archeobactéria *Holobacterium halobium* parecem hibridar com sonda de oligonucleotídeos específicos para essas seqüências. De acordo com esses indícios, então estes elementos repetitivos podem datar desde antes da divisão dos reinos eubacteria e archeobacteria há mais de dois bilhões de anos (Versalovic *et al.*, 1991).

Em 1991, Versalovic e colaboradores sugeriram a utilização dessas seqüências repetitivas ERIC e REP na tipagem molecular de microrganismos. Como essas seqüências estão presentes em muitas espécies de eubactérias, elas poderiam ser utilizadas como sítios de ligação para “primers” específicos em reações de PCR, na produção de “fingerprints” dos diferentes genomas bacterianos (Versalovic *et al.*, 1991). Nessa reação, os “primers” se ligariam às seqüências repetitivas e dependendo da distância entre duas destas seqüências adjacentes (no máximo 5kb dependendo da DNA polimerase utilizada na reação), a porção de DNA compreendida entre elas seria amplificada pela reação de PCR (Figura 1.3). Essas diferentes seqüências amplificadas seriam visualizadas como bandas de diferentes tamanhos em um gel de agarose. Como diferentes isolados bacterianos apresentam polimorfismo quanto ao número e posição dessas seqüências, esse padrão de bandas resultante desta reação de PCR poderia ser utilizado para diferenciá-los. A comparação entre os perfis eletroforéticos de diferentes isolados poderia, portanto, ser utilizada para determinar o grau de similaridade entre as amostras

testadas. Considerando que o perfil de “fingerprint” gerado através desta reação é reprodutível e uma mesma linhagem bacteriana testada repetidas vezes apresenta sempre o mesmo padrão, podemos dizer que esse método de tipagem é um método eficiente, atendendo aos critérios gerais dos métodos de tipagem e ainda, que o padrão de bandas obtido é específico para cada amostra em questão (Lupski & Weinstock, 1992).

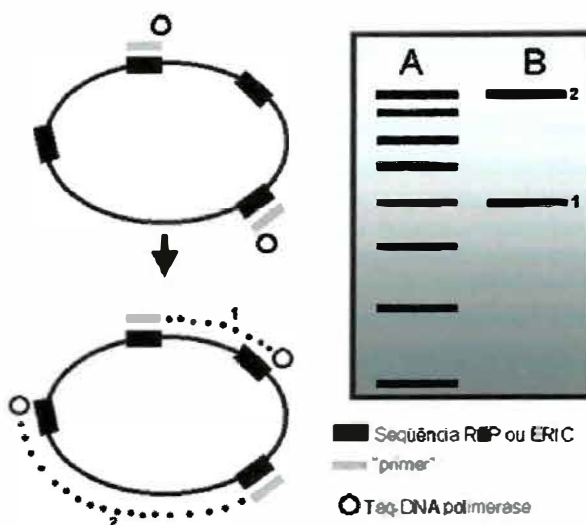


FIGURA 1.3: Esquema representativo de uma reação de PCR de elementos repetitivos (Rep-PCR). Os retângulos pretos representam seqüências REP ou ERIC espalhadas repetidas vezes pelo genoma bacteriano. Os retângulos cinzas representam os “primers” que se ligam a essas seqüências durante a reação de PCR. O círculo pequeno representa a enzima Taq-DNA polimerase. À direita encontra-se um esquema representando um gel de agarose com as duas respectivas bandas obtidas durante a suposta reação (1 e 2), linha B, referente às duas linhas pontilhadas do esquema. A linha A representa um marcador de bases moleculares, utilizado como referência.

2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Shigella spp. são microrganismos endêmicos na região de Ribeirão Preto. Existe uma importância epidemiológica das amostras analisadas no presente trabalho, principalmente em sua associação com infecções graves em humanos, principalmente crianças de até 10 anos de idade, que faz com que trabalhos com o intuito de determinar padrões de sensibilidade a antibióticos e tipagem molecular se tornem necessários para a determinação das relações genéticas envolvidas entre as amostras isoladas na região no decorrer de um ano.

Poucos trabalhos avaliaram ainda a capacidade de Rep-PCR (*Repetitive Elements PCR*) em discriminar amostras de *Shigella* spp endêmicas (Liu et al., 1995). Além disso, nenhum trabalho tentou avaliar a capacidade de Rep-PCR na discriminação entre as “espécies” de *Shigella* spp, com o intuito de se determinar as relações de similaridade existentes dentro do grupo *Shigella* spp.

O objetivo geral deste projeto foi realizar a tipagem molecular de amostras de *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* isoladas na região de Ribeirão Preto, pelos resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos, ribotipagem, ERIC-PCR e REP-PCR, associando os resultados obtidos com cada técnica e verificar a possível origem clonal das amostras multirresistentes (MR). Além disso, fragmentos conservados obtidos através do ERIC-PCR foram submetidos ao sequenciamento com o objetivo de se determinar se tais seqüências seriam correspondentes ou não nas diferentes amostras bacterianas. Como objetivos específicos podemos citar:

1. Verificar se os diferentes métodos de tipagem seriam eficientes na discriminação das amostras locais em termos de revelar o real polimorfismo genético existente na população bacteriana e suas similaridades genéticas;
2. Comparar as diferentes técnicas de tipagem quanto à capacidade discriminatória;
3. Avaliar a diversidade genética de *Shigella* spp., inferindo, pelas diferentes metodologias de tipagem, as relações de similaridade existentes dentro do grupo *Shigella* spp.;
4. Verificar a possível origem clonal das amostras multirresistentes;
5. Determinar a seqüência de nucleotídeos de um fragmento conservado obtido através de ERIC-PCR para possível utilização em futuras análises diagnósticas.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostras bacterianas

No presente trabalho foram analisadas 75 amostras de *Shigella* spp. isoladas de fontes diversas, conforme descrito a seguir. As amostras de *S. flexneri*, *S. sonnei* e a amostra SB03 de *S. boydii* (64 amostras ao todo) foram isoladas de pacientes atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000 pelo laboratório de Microbiologia da Unidade de Emergência, sob coordenação do Prof. Dr. Roberto Martinez, docente do Departamento de Clínica Médica da FMRP.

A amostra SB8135 de *S. boydii*, assim como seis amostras de *S. dysenteriae* (sete amostras ao todo) foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto-SP em abril de 2003. Quatro linhagens-padrão foram também utilizadas no trabalho. São elas: *S. flexneri* SF2457T, *S. sonnei* SSBS514, *S. dysenteriae* SD3818T e *S. boydii* SBBS605. Essas linhagens-padrão foram gentilmente cedidas pelo professor Anthony T. Maurelli (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda – Maryland-EUA). As amostras estão exibidas na Tabela IV da sessão resultados, junto com as características de resistência a antibióticos.

As amostras bacterianas da Unidade de Emergência e do Instituto Adolfo Lutz foram isoladas de fezes diarréicas em meio MacConkey e SS (Oxoid Ltda., Inglaterra). Elas foram então identificadas quanto ao gênero com a utilização do Sistema Automatizado Microscan Dried Gram Negative (Dade Behring). A espécie foi identificada pela reação com anti-soro específico (Probac, São Paulo-SP, Brasil).

3.2 – Teste de sensibilidade a antibióticos

A determinação da sensibilidade a drogas foi realizada pelo método de difusão em disco, de acordo com Bauer *et al.* (1966). As amostras foram incubadas em estufa (Fanem, São Paulo-SP, Brasil) a 37°C em meio líquido LB - Luria Bertani (Oxoid) e inoculadas em placas de vidro de 14cm de diâmetro contendo meio sólido LB-ágar (Oxoid). A medida dos halos de resistência foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada através de visualização contra a luz, e o diâmetro dos mesmos foi comparado com os valores indicados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards - 2003).

No presente teste foram utilizados os discos de antibióticos Sensifar (Cefar Diagnósticos Ltda. São Paulo – SP), cloranfenicol (30µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), gentamicina (10µg), sulfonamida (300µg), tetraciclina (30µg), tobramicina (10µg) e ácido nalidíxico (30µg).

3.3 - Extração de DNA genômico

O DNA genômico bacteriano para ser utilizado nas técnicas de tipagem molecular foi extraído conforme descrito anteriormente por Covone e colaboradores (1998). De uma forma resumida, as amostras bacterianas foram cultivadas em meio LB líquido – (Oxoid) por 24 horas em estufa a 37°C (Fanem, São Paulo-SP, Brasil). As células foram então sedimentadas por centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415R) a 14000rpm por 4 minutos, e suspendidas em 250µl de *solução I* - 20% sacarose (Gibco BRL, EUA), Tris-HCl 50mM, pH 8 (Invitrogen-LifeTechnologies, EUA) e EDTA 50mM (USB-Amersham Life Science, EUA) a 4°C. Após 10 minutos, as células foram lisadas em 500µl de *solução II* - NaCl 100mM (J.T.Baker, México), 1% sarcosil

(USB-Amersham Life Science, EUA) e 0,25U de Proteinase K (Invitrogen-LifeTechnologies, EUA). Logo após as proteínas bacterianas serem digeridas por tratamento com a proteinase K, as amostras foram submetidas à extração do DNA com solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (USB/Quimex, Brasil/Mallinckrodt, EUA) na proporção de 25:24:1 respectivamente, e depois com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. A fase superior foi então precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto a 4°C (J.T.Baker, México), sendo o DNA sedimentado por centrifugação e secado por 40 minutos em centrífuga a vácuo Speed-Vac ISS100 (Savant instruments). O sedimento foi ressuspensionado em 100 a 200µl de água deionizada. Depois de terminada a extração, as amostras foram avaliadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% (Invitrogen-Life Technologies) conduzida a 80 Volts, e a quantificação foi realizada por espectrofotometria de ultravioleta utilizando comprimento de onda de 260nm (Eppendorf Bio Photometer).

3.4 – Ribotipagem

3.4.1 – Preparação da sonda de rDNA

O fragmento de DNA utilizado como sonda na ribotipagem contém as seqüências de 5S, 16S e 23S de DNA ribossômicos. Este fragmento foi obtido por digestão do plasmídeo p64 com a enzima de restrição *SaI* (Gibco BRL) (Zarko-Postawaka *et al.*, 1997), liberando um fragmento de aproximadamente 10Kb contendo todo o *operon* rDNA (Figura 3.1). Em seguida, este fragmento foi purificado por eletroeluição (Sambrook *et al.*, 1987). Resumidamente, a eletroeluição consiste em cortar o gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (Gibco BRL) no local onde se visualizou o DNA de interesse, que no caso equivalia a um fragmento entre 9 e 10 kb. O pedaço do gel cortado foi colocado

cuidadosamente em um saco de diálise (Gibco BRL-Life Technologies) com tampão TAE 1x esterilizado (40mM TRIS-Acetato e 1mM EDTA), o qual foi fechado e colocado em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1x cobrindo-o. Após duas horas a 60 Volts, o pólo da cuba foi invertido e a corrida conduzida a 100 Volts por mais um minuto. Dessa forma, o DNA migrou para fora do pedaço de gel e entrou em solução com o TAE contido no saco de diálise. O conteúdo do saco de diálise foi então dividido em tubos de 1,5ml (Eppendorf) e precipitado com 0,2M de NaCl e 2,5 volumes de etanol absoluto a 4°C. Após 1 hora de incubação a -20°C, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga a 14.000rpm durante 15 minutos a 4°C e os precipitados foram então lavados com etanol 70% e secos em centrífuga a vácuo Speed-Vac ISS100 (Savant instruments) por 10 minutos e ressuspensos com 50µl de água deionizada. Após uma hora em geladeira foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a eficiência da purificação e o restante da sonda foi estocado a -20°C.

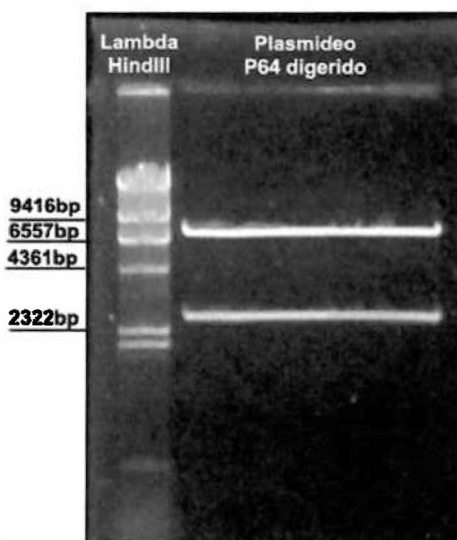


FIGURA 3.1: Perfil do plasmídeo p64 após digestão com *SaI*. O fragmento de maior peso molecular (aproximadamente 9000 pares de base) foi eletroeluído e marcado com fluoresceína.

3.4.2 – Marcação da sonda de rDNA

Após a eletroeluição do fragmento de rDNA contido no plasmídeo p64, este foi submetido à reação de marcação “fria” (marcação com fluoresceína) pela técnica de “random priming”. Para tal marcação foi utilizado o kit *Gene Images Random Prime Labelling Module* (Amersham Pharmacia Biotech – UK), seguindo-se a metodologia sugerida pelo fabricante. Em resumo, de 2 a 25ng/ μ l do DNA purificado na eletroeluição foram diluídos em água deionizada em um tubo de 1,5mL, o qual foi colocado por 5 minutos a 100°C para ocorrer a desnaturação do DNA e conseqüente abertura da dupla fita. Em seguida, foram adicionadas ao tubo a mistura de nucleotídeos contendo o nucleotídeo dUTP marcado (Fluoresceína-11-dUTP), os “primers” randômicos, e a enzima Klenow, contidas no Kit, deixando a reação incubada a 37°C durante 1 hora em banho de água fervente. Em seguida, foram adicionados 20mM de EDTA para inativação da Klenow e o tubo, devidamente protegido contra a luz embrulhado com papel alumínio, foi estocado a –20°C para uso posterior na ribotipagem.

3.4.3 – Digestão com enzima de restrição

Para a ribotipagem foram utilizados o equivalente a 4 μ g de DNA genômico para serem digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (New England-BioLab), seguindo-se as recomendações do fabricante. A reação de digestão ocorreu a 37° em aproximadamente 16 horas. Após a digestão, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, a aproximadamente 74 Volts (Figura 4.5, sessão Resultados). Como marcador para as corridas eletroforéticas das digestões foram utilizados o 1kb Plus DNA Ladder (MBI Fermentas) e o bacteriófago λ digerido com *HindIII* (λ *HindIII* – Gibco BRL).

3.4.4 - Southern Blotting e hibridação de ácidos nucléicos

Após a digestão, os fragmentos de DNA separados em gel de agarose 0,8% foram transferidos para membrana de náilon (Hybond-N+ - Amersham Pharmacia Biotech) por Southern Blotting (Southern, 1975) conforme metodologia descrita em Ausubell *et al.* (1997). O gel de agarose 0,8% foi lavado em água deionizada por cinco minutos sendo em seguida tratado com *solução de desnaturação* - NaOH 0,5N (MERCK, Alemanha) e NaCl 0,5N por 30 minutos em constante agitação à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi tratado com uma *solução de neutralização* - Tris HCl 0,5M pH7,0 e NaCl 2M por mais 30 minutos também à temperatura ambiente, seguida por um tratamento com *solução de transferência 20x SSC pH7,0* - NaCl 3M e Citrato de Sódio 0,3M (MERCK). Após os tratamentos, o aparato para a transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel para a membrana de náilon foi montado de acordo com a Figura 3.2.

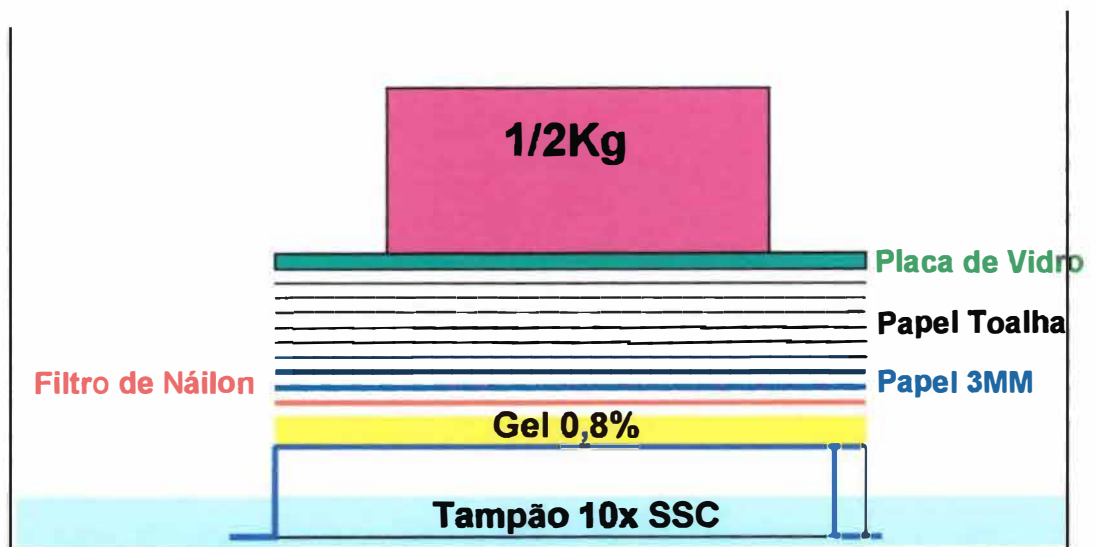


FIGURA 3.2: Esquema representativo da montagem do aparato utilizado na transferência do DNA digerido do gel de agarose para membrana de náilon (Southern Blotting).

Dentro de uma cuba plástica foram colocados 200ml de solução 10x SSC e uma base de acrílico como suporte para o gel de agarose. Sobre o gel foi colocada a membrana de náilon coberta por dois pedaços de papel de cromatografia (Chromatography Paper 3MM-Whatman, PGC Scientifics, EUA) seguido de várias camadas de papel toalha dobrados sob uma placa de vidro e um peso de aproximadamente 0,5Kg. Esse aparato foi deixado a temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas para transferência. Após esse período de tempo, o aparato foi desmontado, a membrana de náilon lavada com 6x SSC pH7,0 e colocada entre dois papéis de cromatografia sendo deixada por duas horas à 80°C para secagem e fixação.

Em seguida, a membrana de náilon contendo os fragmentos de DNA foi pré-hibridada com *tampão de hibridação* - 5xSSC, 0,1%SDS (Gibco BRL), 5% de dextran sulfato (Amersham Pharmacia Biotech), e solução bloqueadora (*liquid block* 20x 1:20, Amersham Pharmacia Biotech), previamente aquecida a 60°C. Para a hibridação, 10ng/ml da sonda marcada foi desnaturada a 100°C e adicionada à solução de hibridação. A membrana foi incubada a 60°C com essa solução sob constante e gentil agitação na ausência de luz, durante aproximadamente 16 horas.

Após a hibridação, foram realizadas as lavagens sob condições estridentes com as *soluções A* (1xSSC e SDS 0,1%) e *B* (0,5xSSC e SDS 0,1%) a 60°C sob constante agitação. Seguindo as lavagens, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (*liquid block*), que faz parte do Kit *Gene Images* CDP-Star Detection Module (Amersham Pharmacia Biotech – UK Limited) diluído 10 vezes em *tampão A pH9,5* (Tris HCl 100mM, NaCl 300mM), durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob constante e gentil agitação. Em

seguida, a membrana foi incubada com 10 μ L do anticorpo conjugado anti-fluoresceína-fosfatase alcalina (diluição de 5000 vezes) presente no Kit, em *tampão A pH9,5* contendo 0,5% de soro albumina bovino (USB-Amersham Life Science). O excesso de anticorpo não ligado à sonda contida na membrana foi removido por lavagens com *tampão A pH9,5* contendo 0,3% de Tween 20 (Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil). A fosfatase alcalina ligada à sonda é utilizada para catalisar a produção de luz por decomposição enzimática de um substrato estável de dioxetano, presente na *solução de detecção CDP-Star detection reagent* (Amersham Pharmacia Biotech – UK Limited) aplicada sobre a membrana na concentração de 30 a 40mL/cm². O DNA marcado com fluorescência foi então visualizado por exposição a filmes de quimioluminescência (Hyper Film ECL – Amersham Pharmacia Biotech) em cassetes com intensificadores de sinal (Hypercassette – Amersham Life Science) à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. A revelação do filme foi feita no aparelho automatizado Kodak M35 X-OMAT Processor.

3.5 –REP e ERIC-PCR

As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizadas na realização da tipagem molecular de elementos repetitivos seguiram as condições descritas por Versalovic e colaboradores (1991). Os iniciadores utilizados nas reações estão detalhados na Tabela I a seguir.

TABELA I: Seqüência dos “primers” utilizados nas reações de REP e ERIC-PCR.

Iniciador	Seqüência
ERIC1R	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'
ERIC2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'
REP1RI	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'
REP2I	5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'

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

A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC200 – MJ Research) em volume final de 50µl contendo 50pmol de cada iniciador (Invitrogen-Life Technologies), 100ng do DNA genômico extraído das amostras, 1,25mM de cada dNTP (Eppendorf), 1 unidade de KlenTaq1™ DNA Polimerase (AB Peptides, Inc. EUA), 4mM de MgCl₂ (Gibco BRL) em tampão de reação apropriado provido com a enzima. Para se atingir o volume final de 50µl por tubo, completou-se com água estéril (Gibco BRL) ou água deionizada autoclavada.

O DNA genômico foi inicialmente desnaturado por aquecimento a 94°C por 7 minutos e a amplificação realizada por 30 ciclos constituídos pelos seguintes passos: **1)** desnaturação a 94°C por 30 segundos, **2)** anelamento dos “primers” à fita molde de DNA a 40°C para REP e a 52°C para ERIC-PCR por 1 minuto e **3)** extensão a 65°C por 8 minutos. O último passo da reação consistia de uma extensão final a 65°C por 10 minutos.

Depois de terminada a reação de PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 74 Volts. Todas as corridas eletroforéticas foram acompanhadas de um marcador de peso molecular de 1kb (MBI Fermentas), para que um padrão fosse mantido,

importante no momento da análise do polimorfismo das amostras. O padrão das bandas obtido foi avaliado em 2 reações de PCR diferentes para cada amostra de *Shigella* spp. Quando discrepâncias foram observadas, uma terceira amplificação foi realizada para a confirmação do padrão.

3.6 – Eletroforese horizontal em gel de agarose

Todas as corridas de eletroforese do presente trabalho foram realizadas em gel de agarose (Invitrogen – Life Technologies) na concentração de 0,8% para as digestões de DNA usadas na ribotipagem e a 1,5% para os fragmentos das reações de REP e ERIC-PCR. As corridas foram conduzidas em cubas horizontais (Horizon 11.14, Gibco BRL-Life Technologies) a 74 Volts, exceto onde mencionado o contrário, utilizando tampão TAE 1x (40mM TRIS-Acetato e 1mM EDTA). Após a corrida, o DNA presente no gel foi corado com brometo de etídio 0,5µg/ml (Gibco BRL), visualizado sob luz ultravioleta através de um transluminador de mesa (UVP) e fotografado utilizando-se o software Kodak 1D Science.

3.7 – Análise da similaridade genética

Para a análise do padrão de sensibilidade a antibióticos, foi montada uma matriz na qual a característica resistente recebia o valor um, e a sensibilidade o valor zero. Essa matriz foi em seguida processada pelo software NTSYSpc versão 2.10m (Applied Biostatistics Inc.), gerando um dendrograma de similaridade genética. Na análise computacional foram utilizados o coeficiente de distância genética BAND e o algoritmo de UPGMA (unpaired group method of analysis) (Wen-Hsiung, 1981) como algoritmo para o agrupamento das amostras similares.

Na análise da ribotipagem o filme fotográfico com o padrão de bandas revelado foi escaneado por um “scanner” de iluminação contrária (HP Scanjet 7450C munido do acessório Scanjet XPA) e as bandas foram contadas manualmente, montando-se uma matriz de zero e um. Essa matriz foi posteriormente analisada pelo software NTSYSpc versão 2.10m (Applied Biostatistics Inc.), gerando um dendrograma de similaridade genética. Na análise computacional foram utilizados o coeficiente de DICE (Dice, 1945) e o método de UPGMA (Wen-Hsiung, 1981) como algoritmo para o agrupamento das amostras similares.

Para a análise dos padrões de polimorfismo gerados por REP e ERIC-PCR, a foto dos géis foram salvas no formato de figura TIFF, com 72 dpi de resolução e foram analisadas no programa GELCOMPARE II (Applied Maths, Inc.), gerando dendrogramas de similaridade genética. Para tal análise foi também utilizado o coeficiente de DICE e o algoritmo UPGMA de agrupamento.

3.8 – Cálculo do índice de discriminação

Para o cálculo do índice de discriminação de cada metodologia de tipagem utilizada no presente trabalho foi utilizada uma variação do índice de diversidade de Simpson (Simpson, 1949), que foi inicialmente desenvolvido para o estudo da diversidade animal em diferentes habitats. O índice de discriminação (D) utilizado (Hunter & Gaston, 1988) baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

onde N representa o número total de amostras estudadas, s é o número total de tipos obtidos no dendrograma, e n_j é o número de amostras que pertencem ao tipo j .

3.9 – Sequenciamento de fragmento conservado de ERIC-PCR

Após a realização do ERIC-PCR para todas as amostras estudadas, foi constatada a presença de uma banda de aproximadamente 1200 pares de bases conservada, presente em todos os isolados. Com o objetivo de se fazer o sequenciamento deste fragmento, foram selecionadas aleatoriamente uma amostra de *S. flexneri* (SF43) e outra de *S. sonnei* (SS52) para se fazer um ERIC-PCR e em seguida isolar e seqüenciar esta banda.

Para a purificação da banda do gel de agarose 1,5%, foi utilizado o kit de eluição da Eppendorf (Perfectprep Gel Cleanup Kit, Eppendorf), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, sob visualização em um transluminador de ultravioleta, o fragmento do gel do tamanho desejado foi cortado com o auxílio de um bisturi, sendo em seguida colocado dentro de um tubo de 1,5mL e pesado em balança de precisão (Acculab LT320, Alemanha). Foram adicionados a esse fragmento três volumes de solução de ligação (*binding buffer*, provida no Kit da Eppendorf) para cada 1 volume de gel e incubado por 10 minutos a 50°C. Em seguida, foi adicionado 1μL de álcool isopropílico (Mallinckrodt, EUA) para cada 1mg do gel.

Essa solução foi colocada em uma coluna com resina (*spin column*, contida no Kit), e a coluna foi inserida em um tubo coletor de 2mL (também provido no Kit). Essa montagem foi centrifugada a 10000xg por um minuto, e em seguida todo o material contido no tubo coletor foi jogado fora. A coluna foi colocada em um tubo coletor novo e seguiu-se uma segunda centrifugação nas

mesmas condições, após a adição do tampão de lavagem (*washing buffer*, contido no Kit). Da mesma maneira, o conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada em novo tubo e adicionou-se 30 μ L de água deionizada no centro da coluna. O sistema foi submetido à centrifugação a 10000xg por um minuto, para ocorrer a eluição do DNA que estava imerso na resina da coluna. Para confirmar o resultado deste procedimento, 3 μ L do fragmento eluído de ambas as amostras foi aplicado em um gel de agarose 0,8% (Figura 3.3).

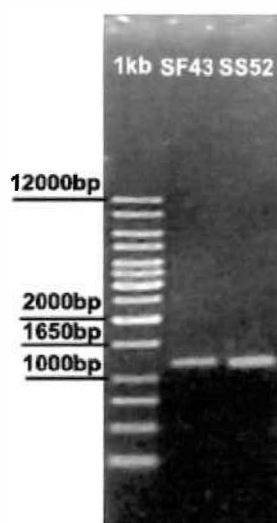


FIGURA 3.3: Gel de agarose 0,8% com os fragmentos de ERIC-PCR eluídos.

SF = *S. flexneri*, SS = *S. sonnei*.

Após a eluição dos fragmentos conservados do ERIC-PCR das amostras SF43 e SS52, eles tiveram sua seqüência de nucleotídeos obtida por sequenciamento automático no seqüenciador de capilar MegaBACE™. Desta forma, 600 ng do produto da eluição foi adicionado a 50 pmol de cada par de primer ERIC1R e ERIC2 e a 4 μ L de solução do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience), em um volume final de 10 μ L. Essa solução foi submetida a uma reação de PCR em termociclador (MJ research PTC 200) nas seguintes condições: 35 ciclos constituídos pelos seguintes

passos: **1)** desnaturação a 95°C por 20 segundos, **2)** anelamento a 50°C por 15 segundos e **3)** extensão a 60°C por um minuto e 20 segundos.

Após a realização da reação de PCR, as soluções foram transferidas para microplacas de 96 pocinhos (Millipore, EUA) e submetidas a uma precipitação de DNA (Ausubel et al, 1999) em acetato de amônio 7,5M – (Merck) e etanol (J. T. Baker, México) numa concentração final de 70%. Os sedimentos obtidos foram, então, lavados em etanol 100% e depois em etanol 70%, para serem secos e ressuspensos em “*load solution*” (Amersham Bioscience), eliminando-se dideoxynucleotídeos não incorporados.

Esse DNA precipitado foi submetido ao seqüenciador MegaBACE™ 1000. A seqüência de DNA obtida para cada um dos produtos de PCR foi submetida ao banco de dados BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), para a busca de homologia com amostras de DNA seqüenciados de *S. flexneri* linhagem 2457T e 301 e *S. sonnei* linhagem 53G (sequenciamento incompleto). A comparação da similaridade entre as duas seqüências obtidas foi realizada através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

3.10 - Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas, foi realizado o teste Z para duas proporções (Eberhardt & Fligner, 1977). Este teste baseia-se na hipótese que as proporções são iguais ou diferentes a um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), ou seja, significância estatística foi aceita para $p < 0,05$. Os dados foram plotados em programa desenvolvido pelo Prof. Dr. Alexandre Souto Martinez, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, para o software Excell® Microsoft.

4 - RESULTADOS

4. RESULTADOS

As amostras de *Shigella flexneri* e *S. sonnei* analisadas no presente trabalho foram isoladas entre os meses de janeiro de 1999 e fevereiro de 2000, na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Durante este período foi isolada apenas uma amostra de *S. boydii* (SB03). A frequência de isolamento das “espécies” estudadas está representada na Figura 4.1. As amostras de *S. flexneri* foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, para serem submetidas ao teste de sorotipagem, sob supervisão da encarregada do Setor de Enterobactérias Tânia Mara Ibelli Vaz. De acordo com a sorotipagem, 66,67% das amostras correspondiam ao sorotipo 2 de *Shigella flexneri*, 28,57% pertenciam ao sorotipo 1, e apenas uma amostra era do sorotipo 4 (4,76%).

Conforme os gráficos abaixo mostram, de um total de 64 amostras isoladas, é possível verificar uma maior frequência aparente de *S. flexneri* (51,56%) no período do estudo, embora os testes estatísticos indiquem que essa diferença não é significativa. Amostras de *S. sonnei* foram isoladas em 46,87% dos casos e apenas uma amostra de *S. boydii* foi encontrada. Outro dado relevante diz respeito à distribuição das coletas ao longo do ano. Os meses com a maior frequência de isolados foram os meses de janeiro, fevereiro, março e abril (para um $p < 0,05$), que compreendem ao período mais quente do ano (verão). A maioria dos casos estudados foram de bactérias isoladas de crianças com até cinco anos de idade (71,87%). O perfil detalhado da idade dos pacientes pode ser conferido na Figura 4.2.

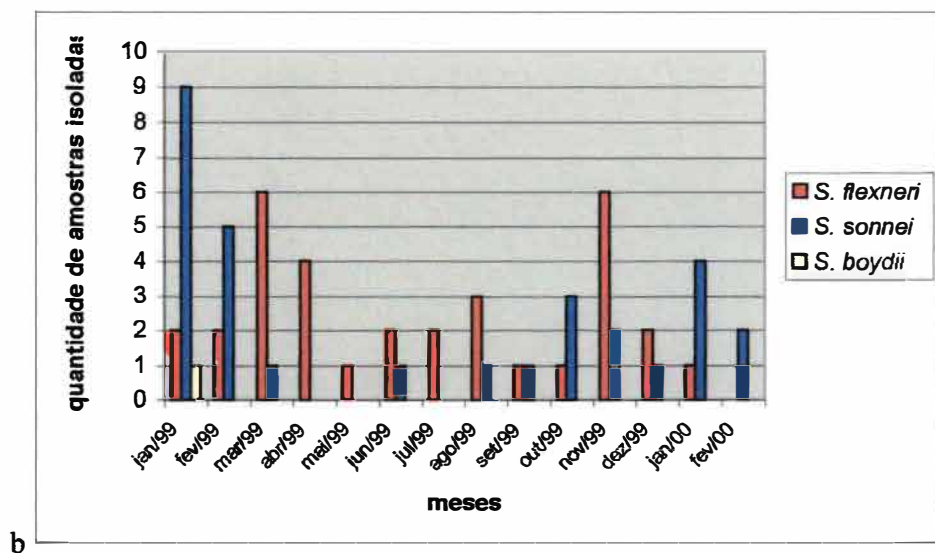
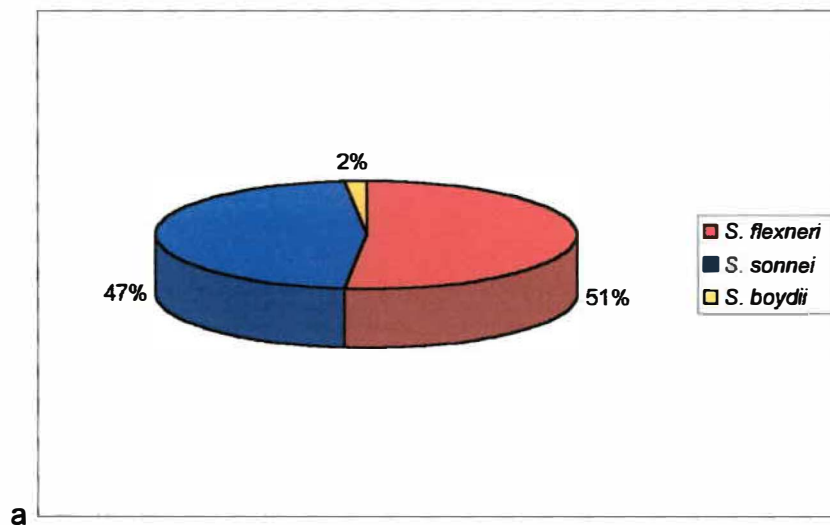


FIGURA 4.1: Frequência das amostras de *S. flexneri* e *S. sonnei* isoladas na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto entre o período de janeiro de 1999 e fevereiro de 2000. a) Porcentagem de *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* isoladas no período. b) Quantidade de amostras de *S. flexneri* (azul), *S. sonnei* (vermelho) e *S. boydii* (amarelo) isoladas por mês durante o período ($p < 0,05$).

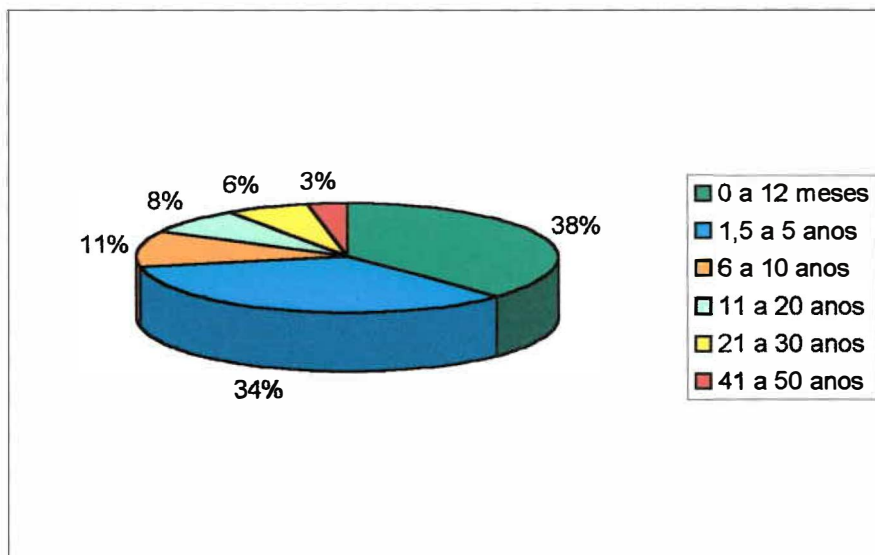


FIGURA 4.2: Gráfico apresentando a organização dos pacientes estudados por idade.

É notável a predominância de crianças de um mês até 10 anos de idade como os pacientes mais freqüentemente infectados pelo patógeno (82,81% dos casos), fato este que é relatado na maior parte dos estudos epidemiológicos realizados com *Shigella* spp. (Kotloff *et al.*, 1999).

A Tabela II a seguir mostra as cidades de procedência dos pacientes atendidos na Unidade de Emergência do HC. É notável que a maior parte dos atendimentos foram feitos com pacientes moradores da cidade de Ribeirão Preto. Não foi possível obter os dados da procedência de 11 pacientes, devido a erros existentes nos prontuários.

TABELA II. Procedência dos pacientes estudados

Cidade	Quantidade de Pacientes
Ribeirão Preto	37
Cajuru	2
Guatapar	1
Cambir	1
Jardinópolis	3
Pontal	1
Pitangueiras	1
Barrinha	5
Cássia dos Coqueiros	1
Nuporanga	1
Sem Informação	11
Total	64

Além das amostras isoladas no Hospital das Clínicas, foram também analisadas, no presente trabalho, seis amostras de *S. dysenteriae* e uma de *S. boydii* cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no mês de abril de 2003, para serem comparadas aos padrões de polimorfismos gerados pelas diferentes técnicas. Estas amostras, todas do sorotipo 2, foram coletadas em diferentes anos pelo próprio instituto. A Tabela III a seguir mostra as características destas amostras.

TABELA III: Dados das amostras coletadas e cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto-SP

Número da Amostra	Sorotipo	Idade do Paciente	Data da Coleta
SD5427	sem informação	48 anos	setembro/1984
SD5823	2	5 meses	Novembro/1986
SD5862	2	3 meses	janeiro/1987
SD6192	2	1 ano	março/1988
SD7172	2	2 anos	julho/1992
SD7361	2	sem informação	março/1993
SB8135	2	1 ms	junho/1996

Com o objetivo de se comparar as amostras regionais com cepas caracterizadas, foram utilizadas também as linhagens padrões das quatro “espécies” de *Shigella* spp., as quais foram cedidas pelo professor Anthony T. Maurelli, conforme descrito anteriormente na sessão Material e Métodos.

4.1 – Sensibilidade a antibióticos

Através da análise dos resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos (Tabela IV) é possível verificar que 35,13% das 64 amostras coletadas na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto são multirresistentes, isto é, são resistentes a, no mínimo, três classes de antibióticos distintos.

A quantidade de 51,51% das linhagens de *S. flexneri* e 19,35% de *S. sonnei*, são caracterizadas como isolados multirresistentes. De 33 amostras de *S. flexneri* e 31 de *S. sonnei* testadas diante de um quadro de 10 antibióticos, verificou-se que apenas cinco amostras de *S. sonnei* apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados. Em todas essas análises, bactérias com sensibilidade intermediária ao antibiótico foram consideradas como sensíveis ao antibiótico em questão. Tal análise revela na população em questão a emergência de linhagens resistentes à ampicilina, tetraciclina e sulfonamida tanto em *S. flexneri* como em *S. sonnei* (Figura 4.3). Todas as amostras testadas foram sensíveis ao ácido nalidíxico (quinolona) e à cefoxitina (aminoglicosídeo).

TABELA IV. Resistência a antibióticos em amostras de *S. flexneri* (SF), *S. sonnei* (SS), *S. dysenteriae* (SD) e *S. boydii* (SB)

AMOSTRA	ANTIBIÓTICOS										PADRÃO RESIST
	NAL	AMI*	AMP*	CFL**	CFX**	CLO	GEN*	SUL	TET	TOB*	
SSBS514	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	MR
SS05	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
SS06	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	MR
SS08	S	S	S	I	S	S	I	R	R	S	
SS09	S	S	S	R	S	S	S	R	R	I	MR
SS10	S	I	R	R	S	S	I	R	S	R	MR
SS11	S	S	R	R	S	S	S	R	I	I	MR
SS12	S	S	S	I	S	S	I	R	R	I	
SS15	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
SS16	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
SS18	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS19	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
SS20	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS22	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
SS30	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	
SS38	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS42	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SS46	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SS49	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
SS50	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SS51	S	I	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS52	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	
SS61	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SS62	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SS65	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SS68	S	S	R	I	S	S	S	R	I	S	
SS69	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SS70	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SS71	S	S	R	I	S	S	S	R	R	S	MR
SS72	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SD3818T	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	
SD5427	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
SD5823	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	MR
SD5862	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	
SD6192	S	S	R	S	S	S	S	R	I	S	
SD7172	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
SD7361	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	
SBBS605	S	S	R	I	S	R	S	R	R	S	MR
SB03	S	I	S	I	S	R	S	R	R	S	MR
SB8135	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	

(continua)

TABELA IV. Resistência a antibióticos em amostras de *S. flexneri* (SF), *S. sonnei* (SS), *S. dysenteriae* (SD) e *S. boydii* (SB) (Continuação)

AMOSTRA	ANTIBIÓTICOS										PADRÃO RESIST.
	NAL	AMI*	AMP*	CFL**	CFX**	CLO	GEN*	SUL	TET	TOB*	
SF2457T	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
SF02	S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	MR
SF07	S	S	S	I	S	S	I	R	R	I	
SF21	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	MR
SF23	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
SF24	S	S	R	I	S	R	S	R	R	S	MR
SF25	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	MR
SF26	S	S	R	S	S	I	S	R	R	S	MR
SF27	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF28	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF29	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF31	S	S	R	S	I	I	S	R	S	S	
SF32	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	MR
SF33	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF34	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	MR
SF35	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF37	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SF40	S	S	R	S	S	I	S	R	R	S	MR
SF41	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	MR
SF43	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	
SF44	S	S	R	I	S	R	R	R	R	R	MR
SF45	S	S	R	S	S	R	S	S	R	I	MR
SF47	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	MR
SF48	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	MR
SF53	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
SF54	S	S	R	S	S	I	S	R	R	S	MR
SF55	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF56	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
SF57	S	S	R	S	S	I	S	R	R	S	MR
SF60	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	
SF63	S	S	R	I	S	I	S	R	R	S	MR
SF64	S	S	R	I	S	R	S	R	R	S	MR
SF67	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	

Legenda: CLO: cloranfenicol, AMI: amicacina, AMP: ampicilina, CFL: cefalotina, CFX: cefoxitina, GEN: gentamicina, SUL: sulfonamida, TET: tetraciclina, TOB: tobramicina, NAL: ácido nalidixico, R: Resistente, I: Intermediário, S: Sensível, MR: Multirresistente.* e ** antibióticos que pertencem à mesma classe (todos os demais pertencem a classes diferentes).

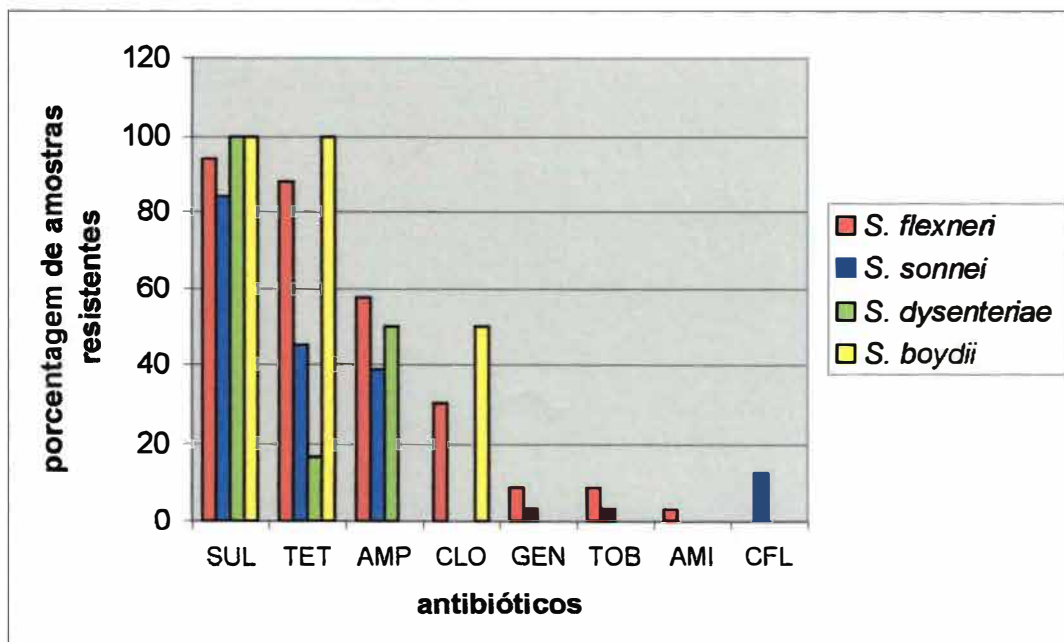


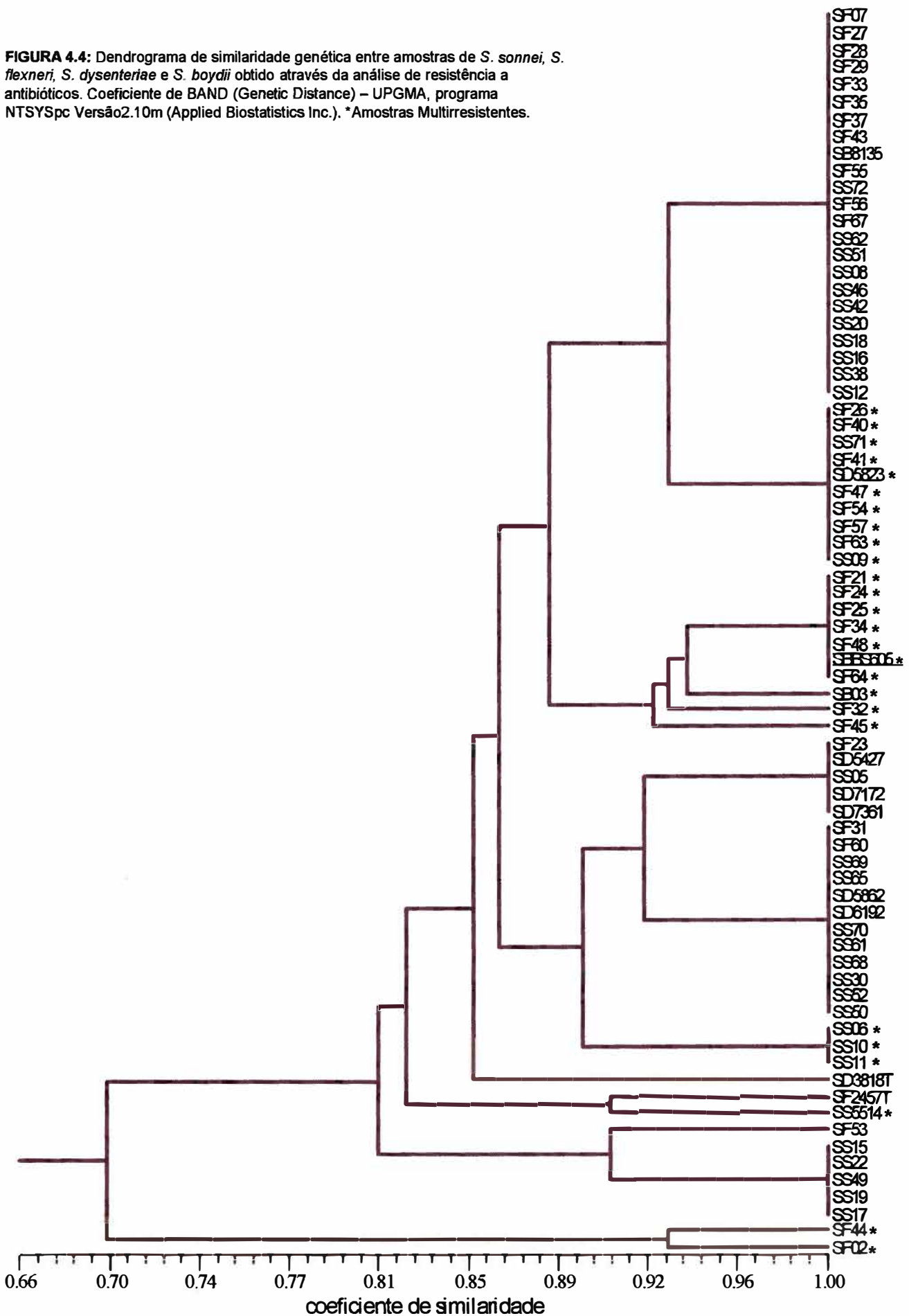
FIGURA 4.3: Padrão de resistência a antibióticos de *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*.

As amostras de *S. dysenteriae* e *S. boydii* apresentaram um padrão distinto de resistência. Apenas uma amostra de *S. dysenteriae* foi considerada multirresistente, apesar de todas as amostras serem resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados. A predominância de linhagens resistentes à ampicilina e sulfonamida (50 e 100% das amostras testadas) também foi evidenciada (Figura 4.3). Em relação a *S. boydii*, as duas amostras analisadas, SB03 isolada na Unidade de Emergência e SB8135 cedida pelo Instituto Adolfo Lutz, apresentaram resistência a sulfonamida (SUL) e tetraciclina (TET). Apenas a amostra SB03 entre as *S. boydii* apresentou resistência a cloranfenicol (CLO). As quatro linhagens padrão de *Shigella* spp. não foram incluídas nessas análises, pois não refletem o padrão de resistência a antibióticos da região de Ribeirão Preto.

Com o objetivo de traçar um padrão de similaridade usando o padrão de resistência obtido através do antibiograma como ferramenta para a tipagem dos isolados bacterianos em questão, foi montada uma matriz numérica, onde a resistência a determinado antibiótico era computada com o número 1 (um), e à sensibilidade atribuíam-se o número 0 (zero). A partir desta matriz, utilizando o coeficiente de similaridade de distância genética BAND e UPGMA (*unpaired group method of analysis*) como método de “clustering”, foi gerado um dendrograma (Figura 4.4) utilizando o programa NTSYSpc Versão2.10m (Applied Biostatistics Inc.).

No dendrograma da Figura 4.4 é possível observar 16 grupos distintos, sendo três deles formados por pelo menos 10 amostras diferentes. Dentro desses grupos, ou “clusters”, é possível verificar a presença de amostras de *S. flexneri* junto com *S. sonnei*, e ainda algumas amostras de *S. dysenteriae* e *S. boydii* agrupadas nos “clusters” não distintos. Tal fato sugere que o antibiograma não seria uma ferramenta eficaz na tentativa de se distinguir isolados bacterianos, pois não foi possível separar as quatro “espécies” em grupos distintos.

FIGURA 4.4: Dendrograma de similaridade genética entre amostras de *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* obtido através da análise de resistência a antibióticos. Coeficiente de BAND (Genetic Distance) – UPGMA, programa NTSYSpc Versão2.10m (Applied Biostatistics Inc.). *Amostras Multirresistentes.



4.2 – Ribotipagem

Com o objeto de se analisar o polimorfismo genético das amostras, a primeira técnica de tipagem molecular utilizada foi a ribotipagem. O DNA dos isolados bacterianos foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* (Figura 4.5) e em seguida, transferido para uma membrana de náilon por Southern Blotting seguido de hibridação com a sonda de rDNA. A ribotipagem de todas as 75 amostras analisadas revelou sete padrões distintos de ribotipos. A Figura 4.6 exibe uma membrana com todos os padrões diferentes de RFLP (ribotipos) obtidos na análise das amostras, e a TABELA V separa todas as amostras de acordo com seus respectivos ribotipos.

Através desta análise podemos observar a presença de sete a onze bandas distribuídas entre 12.000 e 5.000 pares de bases que hibridaram com a sonda de DNA ribossômico. De um total de 75 amostras, 33,33% pertenciam ao ribotipo RTI (*S. flexneri*) e 26,67% pertenciam ao ribotipo RTIII (*S. sonnei*). A porcentagem dos outros ribotipos é representada no gráfico da Figura 4.7.

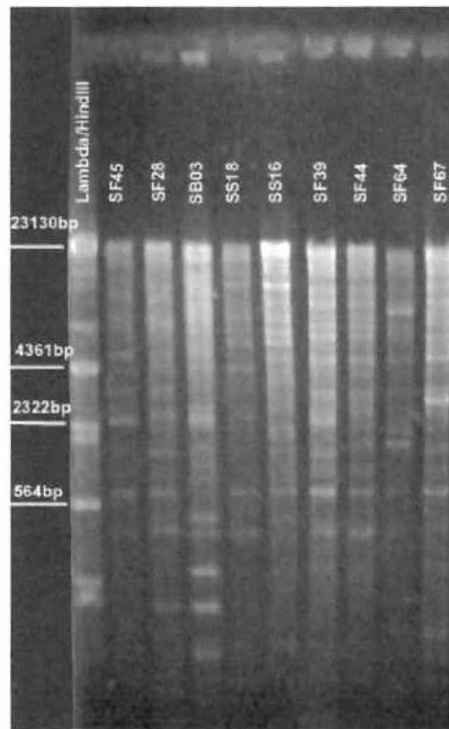


FIGURA 4.5: Gel de agarose 0,8% com DNA extraído de *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* após digestão com a enzima de restrição *HindIII*.

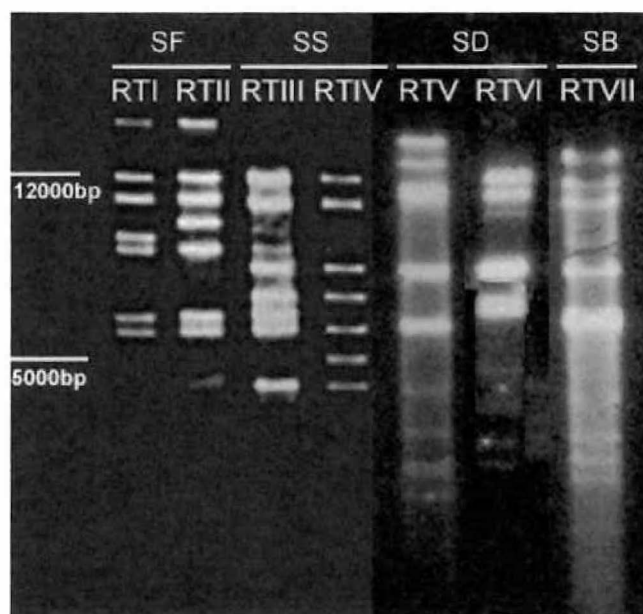


FIGURA 4.6: Filme de quimioluminescência escaneado mostrando os sete ribotipos obtidos através da hibridação do DNA digerido com *HindIII* com a sonda de rDNA P64.

TABELA V - Classificação dos isolados de *Shigella* quanto ao ribotipo

RIBOTIPOS	AMOSTRAS
RTI	2457T, SF02, SF07, SF21, SF23, SF24, SF25, SF26, SF31, SF32, SF34, SF39, SF41, SF44, SF45, SF47, SF53, SF54, SF55, SF56, SF57, SF60, SF63, SF64, SF67.
RTII	SF27, SF28, SF29, SF33, SF35, SF37, SF40, SF43, SF48.
RTIII	SS5514, SS05, SS06, SS08, SS11, SS12, SS15, SS17, SS18, SS22, SS38, SS42, SS50, SS51, SS52, SS61, SS65, SS68, SS69, SS70.
RTIV	SS09, SS10, SS16, SS19, SS20, SS30, SS46, SS49, SS62, SS71, SS72.
RTV	SD5427, SD5823, SD5862, SD6192, SD7172, SD7361,
RTVI	SD3818T
RTVII	SB8135, BS605, SB03

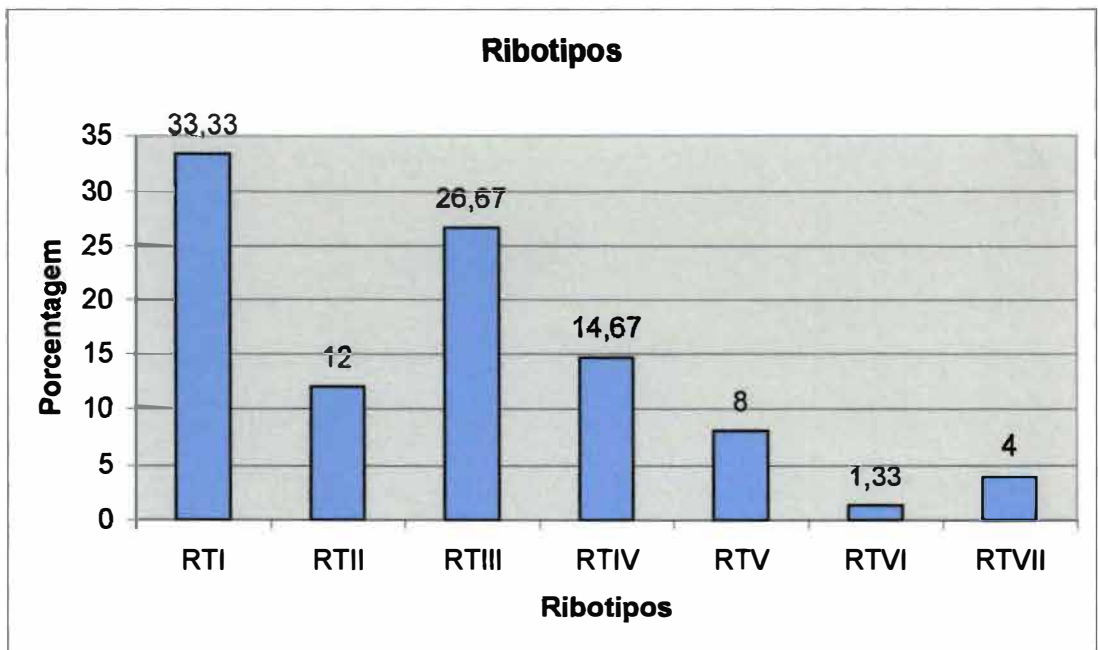


FIGURA 4.7: Representação gráfica da porcentagem de ribotipos obtidos pela ribotipagem de todas as amostras isoladas na região de Ribeirão Preto, incluindo as amostras padrão de cada “espécie” analisada.

De acordo com os resultados é possível constatar que para *S. flexneri* há uma predominância do ribotipo RTI (73,5%) em relação ao RTII, e dentro de *S. sonnei* um predomínio de ribotipo RTIII (64,5%) em relação ao RTIV. Todas as amostras de *S. dysenteriae* coletadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto analisadas são do ribotipo RTV. A amostra padrão *S. dysenteriae* SD3818T apresentou um padrão único e distinto de bandas, sendo classificada como ribotipo RTVI. Todas as amostras de *S. boydii* classificaram dentro do ribotipo RTVII, inclusive a amostra padrão *S. boydii* SBBS605.

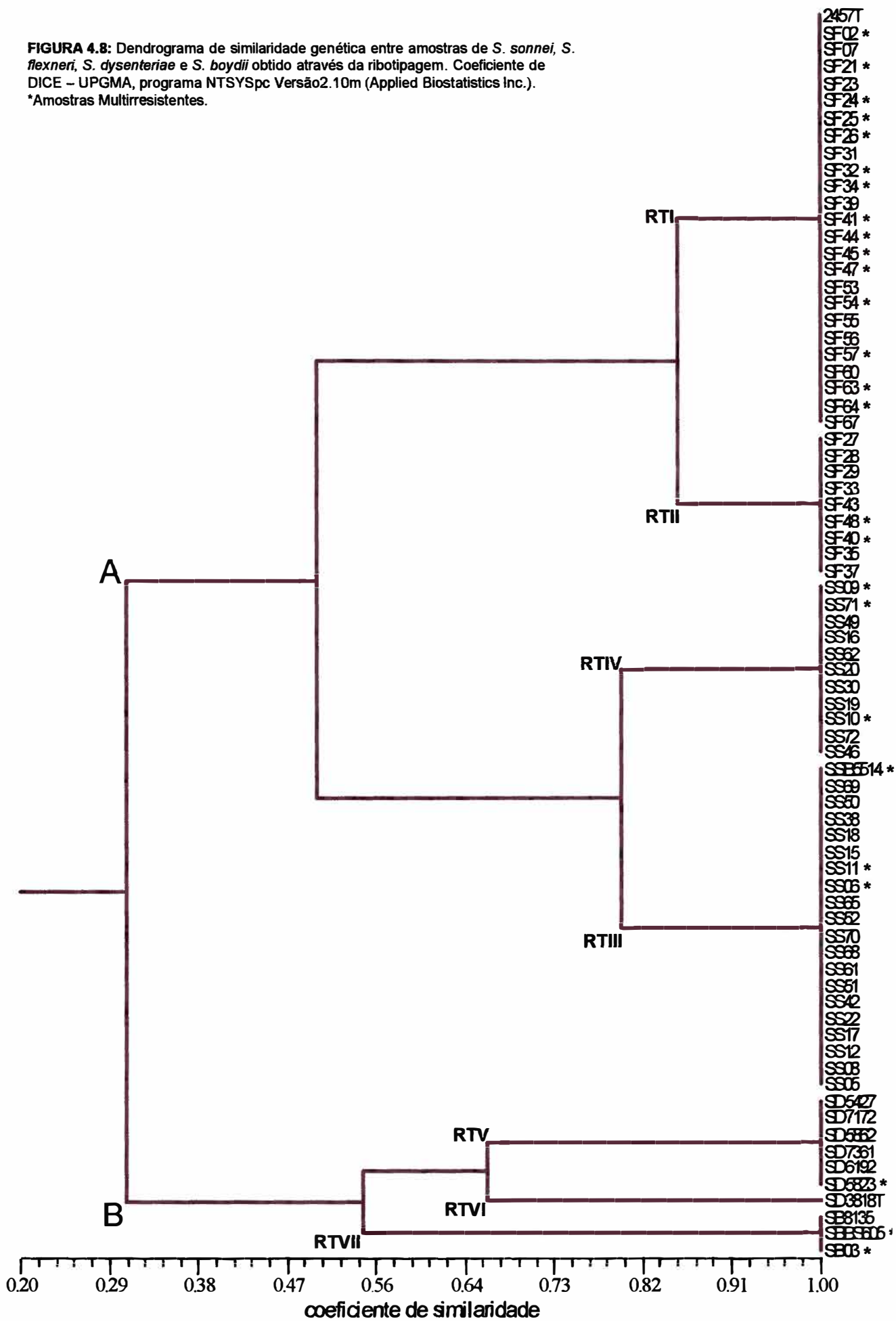
Analisando a distribuição dos ribotipos entre as amostras testadas, verifica-se um padrão homogêneo de perfil do polimorfismo de DNA obtido por esta metodologia. Entretanto, é possível se fazer uma distinção entre *Shigella*

flexneri, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*, pois o padrão de bandeamento obtido é relativamente diferente entre as quatro “espécies” analisadas (Figura 4.6). Desta forma, seria possível identificar a espécie pela análise do ribotipo, indicando que a ribotipagem é um método eficiente para se identificar amostras locais de *Shigella* spp.

As bandas apresentadas na membrana foram contadas e montou-se uma matriz. Na matriz, cada banda recebeu um valor numérico, sendo contadas de cima para baixo no gel. A cada banda presente em determinada amostra, se adotava o número 1 (um), e para cada banda ausente, o número 0 (zero). Realizando-se a contagem dos padrões de bandas, obteu-se uma matriz, a qual foi utilizada para a construção de um dendrograma de similaridade (Figura 4.8), através do coeficiente de DICE, utilizando como fator de “clustering” o método do UPGMA (*unpaired group method of analysis*), pelo programa NTSYSpc Versão2.10m (Applied Biostatistics Inc.).

Pela análise do dendrograma obtido com a ribotipagem é possível verificar a formação de dois “clusters” principais, denominados A e B. Tal observação indicaria que o “gênero” *Shigella* spp. poderia estar dividido em dois grupos principais. O grupo A seria formado exclusivamente de *S. sonnei* e *S. flexneri*, e o grupo B formado de *S. dysenteriae* e *S. sonnei*. Um dado interessante a ser apontado é que a grande maioria das amostras multirresistentes (MR) de *S. flexneri* estão contidas em RTI. Mais de 60% das amostras com o padrão RTI são MR, enquanto que a porcentagem para RTII é de 22%. Em outras palavras, 88,3% das amostras MR de *S. flexneri* estão agrupadas em RTI enquanto 11,7% estão em RTII (Figura 4.8).

FIGURA 4.8: Dendrograma de similaridade genética entre amostras de *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* obtido através da ribotipagem. Coeficiente de DICE – UPGMA, programa NTSYSpc Versão2.10m (Applied Biostatistics Inc.).
 *Amostras Multirresistentes.



4.3 – REP-PCR

A tipagem molecular das amostras foi realizada em seguida utilizando a técnica do REP-PCR. Os iniciadores (“primers”) REP1R-I e REP2-I foram utilizados em uma reação de PCR de acordo com os ciclos descritos por Versalovic *et al.* (1991). A Figura 4.9 mostra um gel representativo com o perfil de bandas obtido a partir dessa metodologia para amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri*, que foram escolhidas por serem as mais representativas da região estudada. Nesse caso, é possível verificar um padrão de bandas diferente entre as duas “espécies”, sendo possível fazer a distinção entre elas. O mesmo foi verificado ao se analisar os perfis das quatro “espécies” (dados não mostrados). Mesmo entre amostras da mesma espécie, é possível observar um polimorfismo, com fragmentos de vários pesos moleculares, variando de aproximadamente 3000 pares de bases a 100 pares de bases.

Todos os géis de eletroforese foram fotografados e analisados pelo programa GELCOMP II (Applied Maths, Inc.), gerando um dendrograma de similaridade através do método de “clustering” UPGMA e coeficiente de DICE (Figura 4.10).

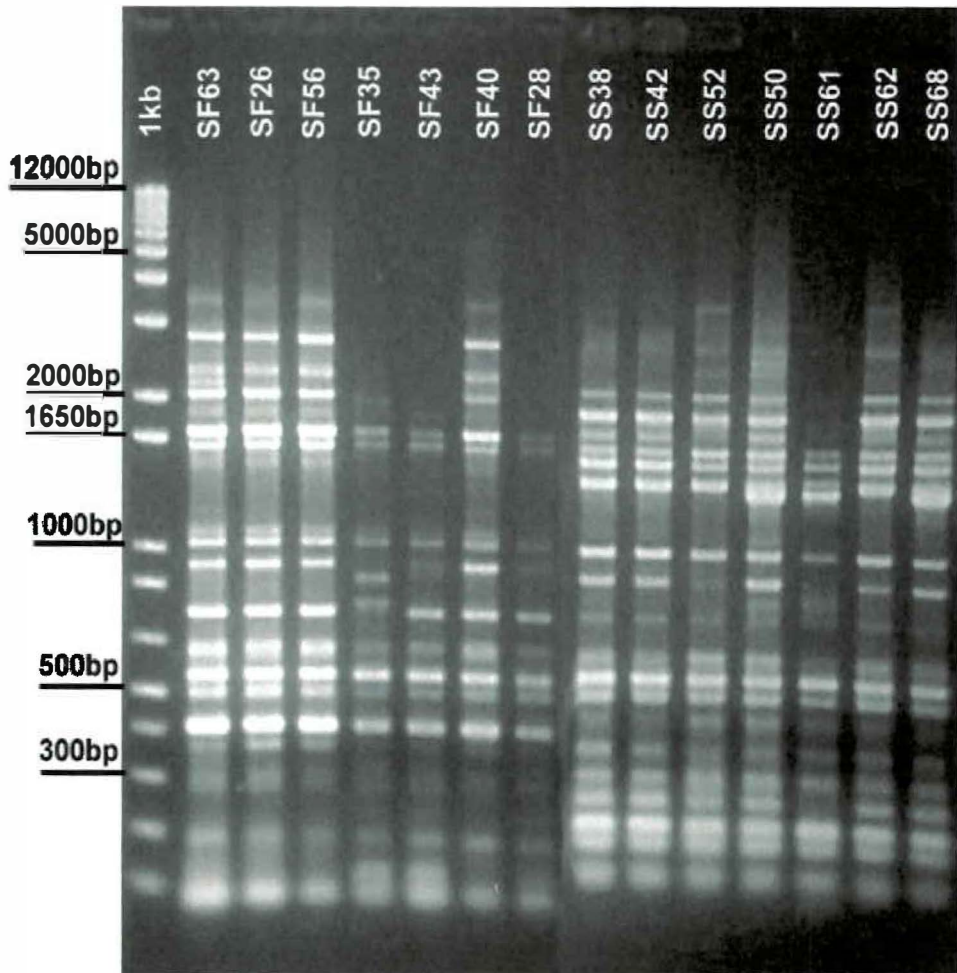
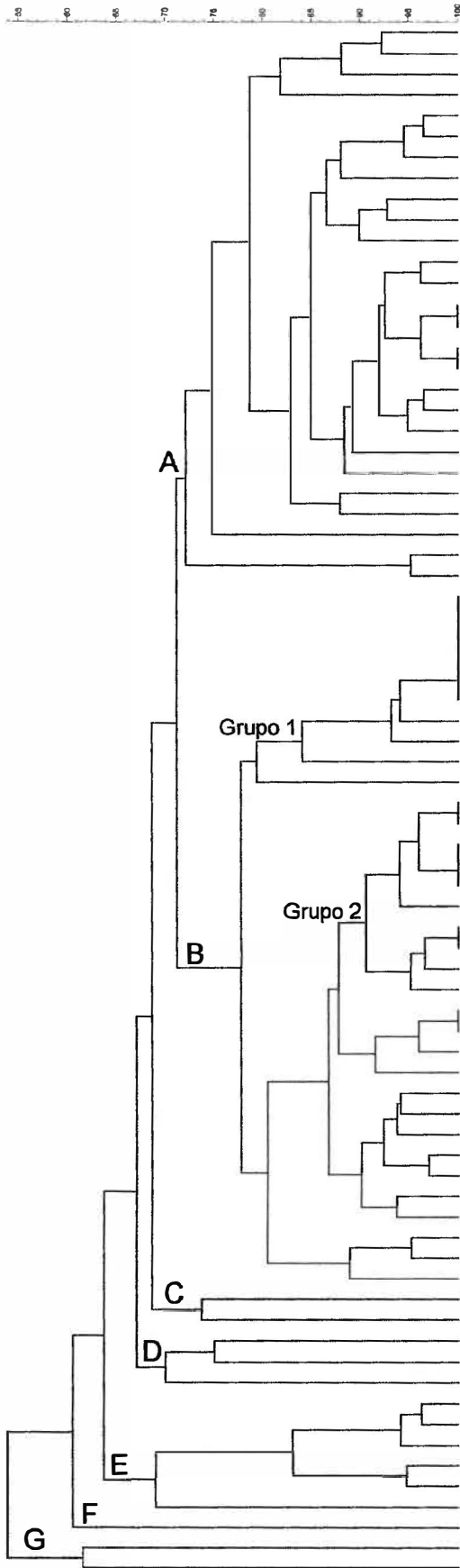


FIGURA 4.9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras de REP-PCR de *S. flexneri* (SF) e *S. sonnei* (SS) analisadas por luz ultra-violeta após tratamento com Brometo de Etídeo.

FIGURA 4.10: Dendrograma de similaridade genética entre amostras de *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* obtido através do REP-PCR. Coeficiente de DICE – UPGMA, programa GELCOMPARII (Applied Maths, Inc.). *Amostras Multirresistentes.

Dice (Opt 1.00%) (Tot 1.0%-1.0%) (H=0.0% B=0.0%) (D 0%-100.0%)
REP

REP



- SS22 *S. sonnei*
- SS30 *S. sonnei*
- SS08 * *S. sonnei*
- SS15 *S. sonnei*
- SS51 *S. sonnei*
- SS05 *S. sonnei*
- SS17 *S. sonnei*
- SS49 *S. sonnei*
- SS69 *S. sonnei*
- SS52 *S. sonnei*
- SS50 *S. sonnei*
- SS65 *S. sonnei*
- SS72 *S. sonnei*
- SS68 *S. sonnei*
- SS71 * *S. sonnei*
- SS38 *S. sonnei*
- SS42 *S. sonnei*
- SS12 *S. sonnei*
- SS62 *S. sonnei*
- SS18 *S. sonnei*
- SS19 *S. sonnei*
- SS70 *S. sonnei*
- SS08 *S. sonnei*
- SS09 * *S. sonnei*
- SS20 *S. sonnei*
- SS61 *S. sonnei*
- SS10 * *S. sonnei*
- SF26 * *S. flexneri*
- SF27 *S. flexneri*
- SF58 *S. flexneri*
- SF39 *S. flexneri*
- SF41 * *S. flexneri*
- SF40 * *S. flexneri*
- SF64 * *S. flexneri*
- SF63 * *S. flexneri*
- SF54 * *S. flexneri*
- SF35 *S. flexneri*
- SF31 *S. flexneri*
- SF37 *S. flexneri*
- SF44 * *S. flexneri*
- SF34 * *S. flexneri*
- SF24 * *S. flexneri*
- SF32 * *S. flexneri*
- SF29 *S. flexneri*
- SF48 * *S. flexneri*
- SF45 * *S. flexneri*
- SF25 * *S. flexneri*
- SF80 *S. flexneri*
- SF55 *S. flexneri*
- SF47 * *S. flexneri*
- SF67 *S. flexneri*
- SF43 *S. flexneri*
- SF53 *S. flexneri*
- SF28 *S. flexneri*
- SF02 * *S. flexneri*
- SF57 * *S. flexneri*
- 2457T *S. flexneri*
- SF33 *S. flexneri*
- SF21 * *S. flexneri*
- SF23 *S. flexneri*
- SF07 *S. flexneri*
- SF43 *S. flexneri*
- 3818T *S. dysenteriae*
- B5514 * *S. sonnei*
- B8605 * *S. boydii*
- SB03 * *S. boydii*
- SD5427 *S. dysenteriae*
- SD5862 *S. dysenteriae*
- SD5823 * *S. dysenteriae*
- SD7361 *S. dysenteriae*
- SD7172 *S. dysenteriae*
- SD6192 *S. dysenteriae*
- SB8135 *S. boydii*
- SS11 * *S. sonnei*
- SS16 *S. sonnei*

No dendrograma obtido acima é possível observar que a tipagem molecular por REP-PCR foi eficaz em separar as quatro “espécies” de *Shigella* spp. em grupos distintos, com poucas exceções. Através da análise do dendrograma é possível distinguir três grandes “clusters” principais, os grupos A, B e E. O grupo A constituído exclusivamente de *S. sonnei*, o grupo B somente de *S. flexneri* e o grupo E com amostras de *S. dysenteriae*. Entretanto, algumas amostras de *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*, principalmente as amostras padrão, encontram-se espalhadas pelo dendrograma sem formar grandes grupos específicos, como pode ser visto nos pequenos “clusters” assinalados com as letras C, D, F e G. As amostras de *S. boydii*, através da técnica de REP-PCR, não aparentam formar nenhum grupo específico. Duas das amostras encontram-se no grupo D (SB03 e a amostra padrão SBBS605), e uma sozinha formando o ramo F (SB8135).

Confirmando os dados obtidos por ribotipagem, muitas amostras multirresistentes de *S. flexneri* foram agrupadas, indicando uma possível origem clonal para estas amostras. Amostras com o mesmo padrão de resistência foram concentradas em um mesmo “cluster”, como é o caso das amostras SF40, SF41, SF54 e SF63 (grupo 1), resistentes a ampicilina, sulfonamida e tetraciclina. O mesmo pode ser dito das amostras SF24, SF25, SF34 e SF48 (grupo 2), resistentes a ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida e tetraciclina (Figura 4.10). Outras amostras com padrões de resistência diferentes, mas também formando grupos com as anteriores, como é o caso de SF64 (grupo 1) ou SF32 e SF44 (grupo 2), podem ser representantes do mesmo clone original tendo sido originadas pela aquisição de resistência a cloranfenicol (SF64), tobramicina (SF32) ou tobramicina e gentamicina (SF44), seja pela ocorrência de mutações ou por transferência gênica lateral (LGT).

Devido ao menor número de amostras multirresistentes de *S. sonnei*, nenhuma análise similar pôde ser realizada.

4.4 – ERIC-PCR

Os iniciadores (“primers”) ERIC1R e ERIC2 também foram utilizados em reação de PCR de acordo com os ciclos descritos por Versalovic *et al.* (1991) na tipagem molecular das 75 amostras bacterianas isoladas. A Figura 4.11 mostra um gel representativo do padrão de bandas obtido através dessa metodologia para amostras de *S. flexneri* e *S. sonnei*. Ao se analisar a figura, é possível notar uma certa diferença nos padrões de bandas entre as duas “espécies” de *Shigella* spp. analisadas, e mesmo entre amostras da mesma “espécie” é possível também se observar um polimorfismo. Embora não esteja mostrado na figura, o mesmo foi observado para todas as quatro “espécies” estudadas. O dendrograma obtido após o processamento dos dados no programa GELCOMP II (Applied Maths, Inc.) utilizando as mesmas condições da análise do REP-PCR está exposto da Figura 4.12.

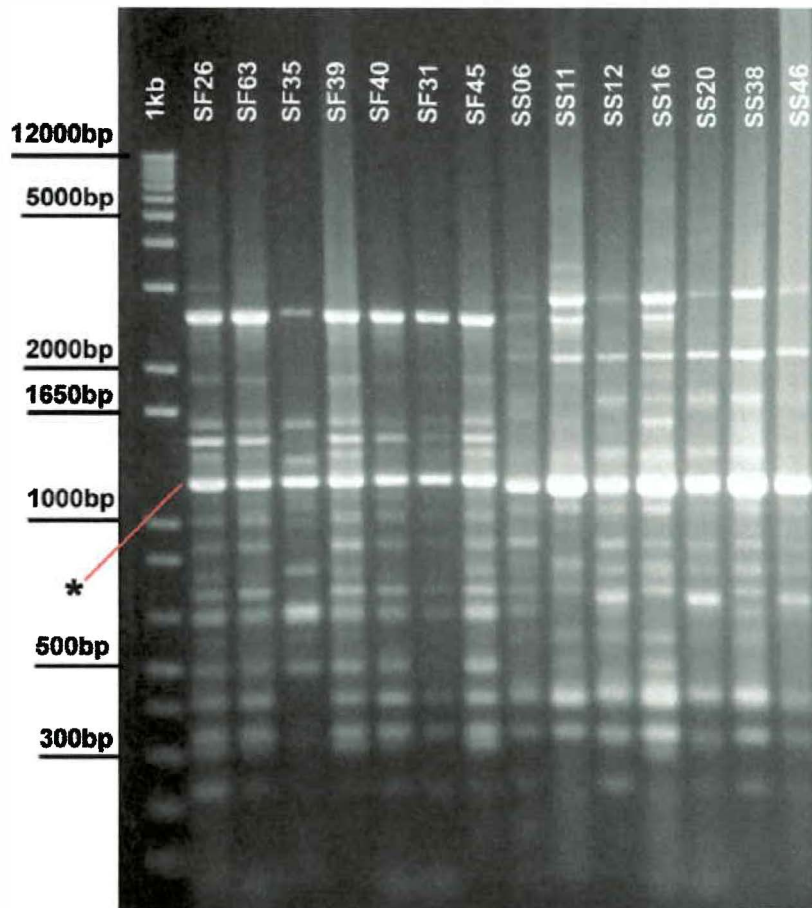
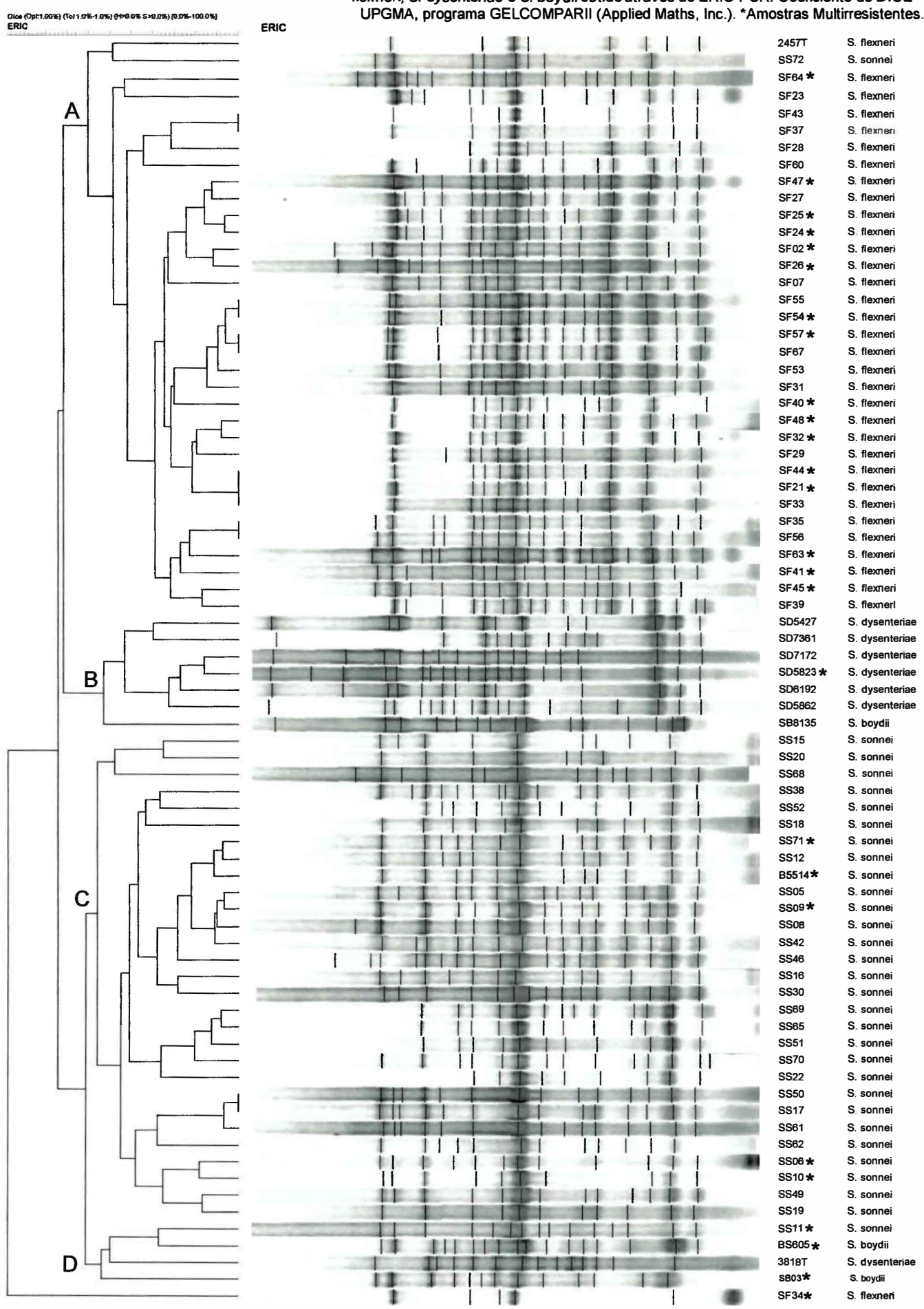


FIGURA 4.11: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras de ERIC-PCR de *S. flexneri* (SF) e *S. sonnei* (SS) analisadas por luz ultra-violeta após tratamento com Brometo de Etídeo. *Assinala o fragmento que foi eluído e seqüenciado (discutido adiante).

FIGURA 4.12: Dendrograma de similaridade genética entre amostras de *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* obtido através do ERIC-PCR. Coeficiente de DICE – UPGMA, programa GELCOMPARII (Applied Maths, Inc.). *Amostras Multirresistentes.



No dendrograma obtido acima é possível observar que a tipagem molecular por ERIC-PCR foi também eficaz em separar as quatro “espécies” de *Shigella* spp. em grupos distintos, com poucas exceções. O dendrograma revela quatro “clusters” diferentes, o grupo A, constituído de amostras de *S. flexneri*, com exceção da amostra de *S. sonnei* SS72, o grupo B formado por amostras de *S. dysenteriae* e a amostra de *S. boydii* SB8135, o “cluster” C constituído exclusivamente de amostras de *S. sonnei*, e o grupo D formado por amostras representativas das quatro “espécies” estudadas. Uma única amostra de *S. flexneri* (SF34) encontra-se fora de qualquer “cluster”, sendo o grau de similaridade dela com as demais amostras muito baixo (coeficiente de aproximadamente 47%). Novamente, amostras multirresistentes de *S. flexneri* foram agrupadas. Diferente de REP-PCR, as amostras MR de *S. sonnei* foram agrupadas em dois “clusters” distintos (Figura 4.12).

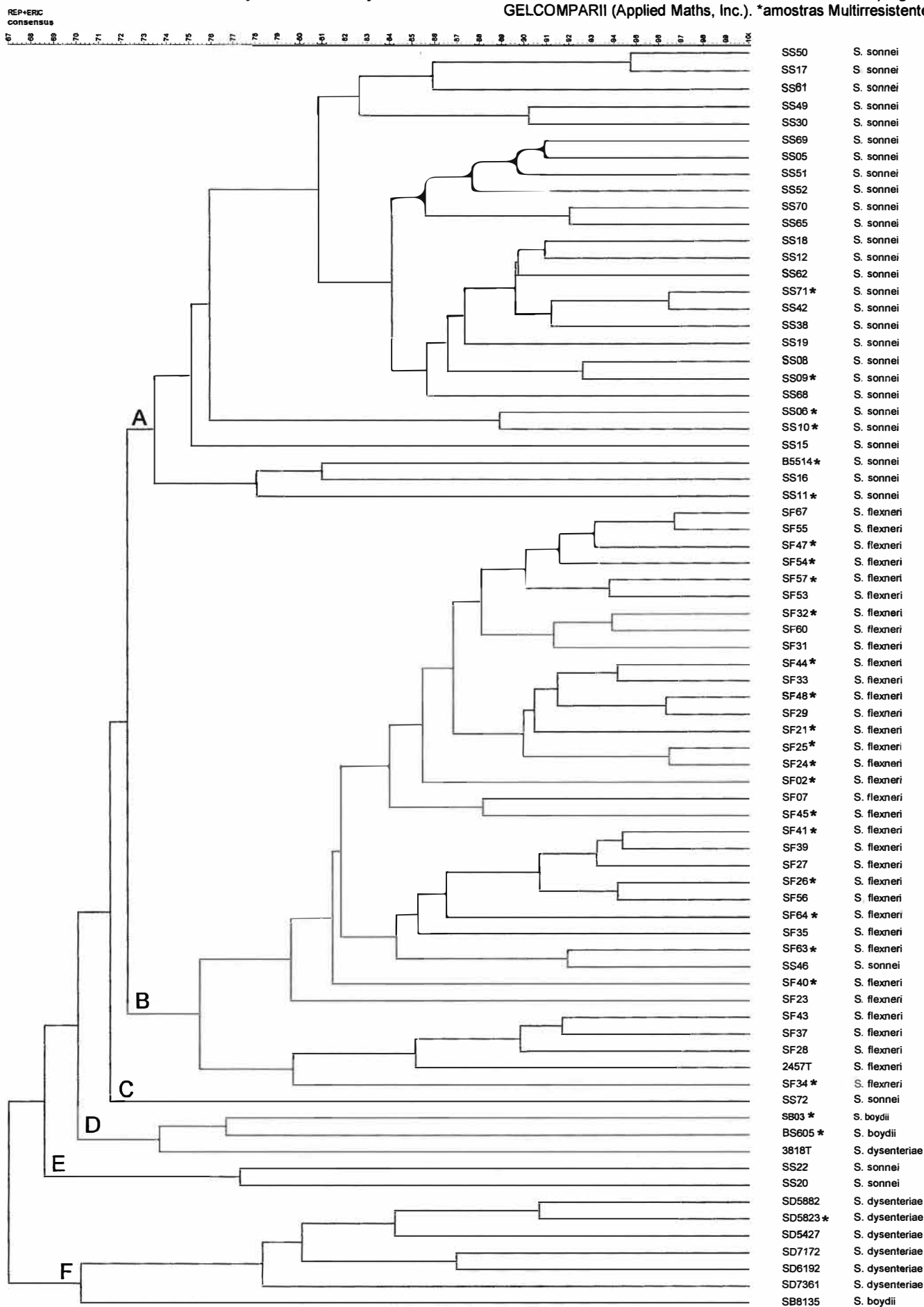
4.5 – Dendrograma consenso entre REP-PCR e ERIC-PCR

Com o objetivo de se aumentar o índice discriminatório da análise dos perfis de bandas, chegando dessa maneira a resultados mais consistentes, os dados obtidos pelas técnicas de REP-PCR e ERIC-PCR foram agrupados e gerou-se um dendrograma consenso entre essas duas técnicas (Figura 4.13).

O dendrograma consenso também foi eficaz em separar as quatro “espécies” de *Shigella* spp. em grupos distintos. ERIC e REP juntos separaram as amostras em três “clusters” principais, o grupo A formado por amostras de *S. sonnei*, o grupo B formado por amostras de *S. flexneri* e a amostra SS46 de *S. sonnei*, e o grupo F formado por *S. dysenteriae* e a amostra SB8135 de *S. boydii*. Algumas amostras se encontraram não formando grupos nenhum. Elas podem ser visualizadas nos nós C, D e E. Este resultado foi muito semelhante

ao obtido através da análise do REP-PCR isoladamente. Amostras MR também foram agrupadas neste dendrograma consenso, confirmando dados anteriores.

FIGURA 4.13: Dendrograma de similaridade genética consenso entre amostras de *S. flexneri*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* obtido através do REP e do ERIC-PCR. Coeficiente de DICE – UPGMA, programa GELCOMPARI (Applied Maths, Inc.). *amostras Multirresistentes.



4.6 - Cálculo do índice de discriminação

Com o objetivo de se analisar matematicamente qual metodologia de tipagem utilizada teria o maior poder discriminatório, foi utilizado o índice de discriminação D (Hunter & Gaston, 1988). Os resultados obtidos através destes cálculos está representado na Tabela VI abaixo.

TABELA VI – Resultado do cálculo do índice de discriminação obtido através das diferentes metodologias de tipagem

Metodologia	Índice de discriminação
Antibiograma	0,8489
Ribotipagem	0,7842
REP-PCR	0,9917
ERIC-PCR	0,9971
Consenso entre REP e ERIC-PCR	1,0000

De acordo com os dados obtidos acima é possível inferir que o dendrograma consenso entre REP e ERIC-PCR seria a metodologia de análise que apresentou a maior capacidade de discriminar as amostras analisadas. Em contrapartida, a ribotipagem gerou um menor polimorfismo, que é refletido em seu baixo índice de discriminação (0,7842). Este resultado significa que se pegarmos duas amostras aleatoriamente dentro da população estudada existe uma probabilidade de 78,42% delas não serem relacionadas, ou seja, estarem dentro do mesmo grupo, ou “cluster”.

4.7 - Sequenciamento de fragmento conservado de ERIC-PCR

Em todos os padrões de eletroforese obtidos por ERIC-PCR foi notada uma banda de aproximadamente 1200 pares de bases presente em todas as amostras analisadas. Esse fragmento, que na Figura 4.11 está assinalado com

um asterisco (*), foi purificado do gel por eluição e sua seqüência de nucleotídeos determinada pelo seqüenciador automático MegaBACE™ 1000. Para tal, foram selecionados as amostras *S. flexneri* SF43 e *S. sonnei* SS52 para obtenção dos fragmentos, que, após seqüenciados, tiveram suas seqüências analisadas no banco de dados BLAST em busca de possíveis seqüências com similaridade. Não foram analisadas seqüências de nenhuma amostra de *S. dysenteriae* e de *S. boydii*, devido ao fato da ênfase deste trabalho ter sido as outras duas espécies.

O sequenciamento direto do produto de PCR revelou uma seqüência de 457 bases para a amostra de *S. flexneri* SF43, com 95% de similaridade com a região de nucleotídeo 160870 a 161317 de *S. flexneri* 2a linhagem 2457T (referência AE016983.1 – GenBank), e região 9790 a 10029 de *S. flexneri* 2a linhagem 301 (referência AE015176.1 – GenBank). Essas regiões não contêm nenhuma ORF conhecida. Esta análise revelou também 91% de similaridade com a região 1038 a 954 de *S. boydii* BH147 (referência AY219466.1 – GenBank), que corresponde à seqüência de inserção IS1SB, e 94% de similaridade com a região de nucleotídeos 140072 a 140519 de *E. coli* linhagem CFT 073 (referência AE016759.1 – GenBank).

O sequenciamento revelou também uma seqüência de 126 bases para a amostra *S. sonnei* SS52, com 90% de similaridade com a região de nucleotídeo 9736 a 9844 de *S. flexneri* 2a linhagem 301 (referência AE015176.1 – GenBank), e região 160816 a 160924 de *S. flexneri* 2a linhagem 2457T (referência AE016983.1 – GenBank). Ambas as regiões também não contêm nenhuma ORF conhecida. Esta análise também revelou 90% de similaridade com a região 1092 a 984 do clone *S. boydii* BH147 (referência AY219466.1 – GenBank), que corresponde à seqüência de inserção IS1SB, e 89% de

similaridade com a região 140465 a 140573 de *E. coli* linhagem CFT 073 (referência AE016759.1 – GenBank).

Após o sequenciamento, as duas seqüências obtidas foram comparadas utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). O resultado dessa comparação pode ser visto na Figura 4.14.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

SEQ_SF43      ACNTAATGATACCTGGCTAACAGTCTG---GCGTTTCTTTTCAGCAACGGGAAGCAAA 57
SEQ_SS52      -----NNTAGACAACAGTCAAACTGCCTGCCTTGTGAATTATTAATAATTCTC 49
              * * ***** ** * *** * * * **

SEQ_SF43      AACCCAACCTGCACCAGCACACCGTCAGCGGCCTGACATTATCCGGCTGCTGCAATGCC 117
SEQ_SS52      CCGCTAACTGAACCCGGCTAACAGTCNGGCG---TGGANTTTTTCAGCAACGGGAAGC- 105
              * *** ** * ** * * * * * * * * * *

SEQ_SF43      ATTAACAAAACAGTA-AGCAATCACTTTTTACCTGTACAGGTGATAATCCAAGATATG 176
SEQ_SS52      AACAAACACACACCGCACAGCA----- 126
              * **** * * * * ****

SEQ_SF43      TATCTACCCAGATGAGTAATCCGAAGTTCATCCATACCACAGGTCACCTGGCTATTCTGT 236
SEQ_SS52      -----

SEQ_SF43      TGTACTCCTGACAAAGAGCAATAATTCTGAATTAGCAACCATGAACTCATCGACAAAAC 296
SEQ_SS52      -----

SEQ_SF43      CTCTGTATAGCATCACTATTCAGAATAATAACGTCTCTTCCCGAAGACGATCAGGAGTA 356
SEQ_SS52      -----

SEQ_SF43      CAGAACAAAACCTGTCAACACGGCTGAAGGCCTTGGCTCGATGCTGCATTGACTATATCAA 416
SEQ_SS52      -----

SEQ_SF43      TACGCCTGCCTAAGGATTGAACAACCCCGACGCCTCATCA 457
SEQ_SS52      -----
    
```

FIGURA 4.14: Alinhamento das duas seqüências de nucleotídeos de *Shigella flexneri* e *S. sonnei* pelo programa ClustalW. *referentes a bases coincidentes.

O resultado do alinhamento mostra que as duas seqüências obtidas são muito semelhantes, compartilhando cerca de 63 nucleotídeos, o que equivale a 50% do total de nucleotídeos que possuem em comum. Estes resultados sugerem que a seqüência obtida para SS52, apesar de ser menor do que a obtida para SF43, seja parte de uma mesma região do genoma de *Shigella* spp. Portanto, o resultado do seqüenciamento sugere que esse fragmento conservado em todas as amostras através do ERIC-PCR seja realmente correspondente a uma mesma porção do genoma destas bactérias.

5 - DISCUSSÃO

5. Discussão

As amostras de *Shigella* spp. aqui avaliadas representam uma grande parte dos casos de diarreia causadas por este microrganismo na região de Ribeirão Preto durante o período estudado, uma vez que a Unidade de Emergência (UE) do Hospital das Clínicas (HC) é um dos principais centros de atendimento à população de Ribeirão Preto e mais 24 municípios da região. Todos os casos de diarreia em que se isolavam o patógeno *Shigella* spp. nesta unidade de emergência, durante o período mencionado, foram coletados e levados ao laboratório de Genômica e Biologia Bacteriana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o que favorece o fato destas amostras representarem uma grande parcela dos casos de shigelose em nossa região.

Devido ao fato de shigelose não ser um caso de notificação compulsória, é difícil obter dados em relação à real representatividade das 64 amostras aqui estudadas, em relação ao total de casos de diarreia na região. O departamento de Vigilância Sanitária de Ribeirão Preto faz, durante todo o ano, coletas de dados de suspeitas de diarreia esporadicamente em 15 das 33 unidades de saúde da cidade. Investigações mais específicas, tais como a realização de coprocultura, determinação da espécie e sorotipagem de amostras isoladas dos pacientes, são realizadas apenas quando é detectado algum surto no decorrer destas análises de rotina. Para fins estatísticos e para o estudo da epidemiologia na região, os casos de diarreia só começaram a ser sistematicamente notificados à vigilância sanitária a partir de 2002, porém, sem a necessidade de se identificar o agente patogênico.

No período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000 não foi notificado nenhum surto de diarreia na região. Portanto, as amostras estudadas no

presente trabalho são referentes à população bacteriana endêmica relativa à região de Ribeirão Preto, e não relacionadas a nenhuma epidemia deste microrganismo. Vale ressaltar que no mesmo período, de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000, o Instituto Adolfo Lutz, que é um dos centros mais importantes da região no estudo de doenças causadas por microrganismos, recebeu 14 amostras de *Shigella* spp. Esse dado vem ressaltar a expressividade das 64 amostras coletadas na UE do HC como representantes do que deve estar acontecendo na população da região como um todo.

Em 2001, Medeiros e colaboradores coletaram dados de hospitais pediátricos da cidade de Ribeirão Preto relativos ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1997 e constataram um total de 419 microrganismos isolados de 1836 pacientes internados com sintomas de diarreia (Medeiros et al., 2001). Entre o período de janeiro de 1994 e dezembro de 1995, foram isolados uma média de 46 amostras de *Shigella* spp. por ano. Almeida e colaboradores (1998) fizeram um estudo semelhante com 196 pacientes de até cinco anos de idade com sintomas de diarreia, atendidos no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – SP, entre fevereiro de 1992 e janeiro de 1993. Destes pacientes, 94 apresentaram pelo menos um patógeno pesquisado, sendo isoladas 41 amostras de *Shigella* spp.

O presente estudo apresenta uma quantidade relativamente maior de amostras isoladas no período de um ano do que os dois trabalhos mencionados, o que provavelmente ressalta a importância da Unidade de Emergência em termos de representatividade em relação às amostras coletadas na região, uma vez que esta unidade hospitalar não foi incluída no estudo de Medeiros et al. (2001). Além disso, nos trabalhos de Medeiros et al.

(2001) e Almeida *et al.* (1998) os dados coletados ficaram restritos a crianças de até 10 anos de idade. Não é mencionado nesses trabalhos qual seria a porcentagem de adultos com sintomas de diarreia atendidos nos hospitais estudados. No presente trabalho, entretanto, se considerarmos apenas os casos de shigelose em crianças com menos de 10 anos de idade, teríamos um total de 53 casos.

Os resultados apresentados por Medeiros e colaboradores (2001), indicavam *Shigella* spp. como o segundo principal patógeno associado a diarreias na região de Ribeirão Preto, estando atrás apenas de EPEC. Almeida *et al.* (1998) mostraram que *Shigella* spp. seria o principal agente causador de diarreia em crianças na região de São José do Rio Preto. Tal fato mostra a real importância de se estudar esse patógeno, em termos de epidemiologia, sensibilidade a antibióticos e patogenicidade.

Vários fatores poderiam estar contribuindo para a disseminação deste patógeno na região, como, por exemplo, as condições higiênicas precárias, que facilitam a disseminação do microrganismo das fezes dos pacientes contaminados para o ambiente, que ocorre principalmente nas áreas mais pobres da cidade, onde há um descaso em relação ao sistema de saneamento básico. Outro aspecto importante consiste na baixa dose infectante. Estima-se que 10 a 100 bactérias são suficientes para o estabelecimento da infecção (DuPont *et al.*, 1989). Tal fato, somado ao contato extenso entre as pessoas em comunidades, favorece a disseminação do patógeno de pessoa a pessoa, uma das principais rotas de disseminação de *Shigella* spp.

A análise dos pacientes estudados no presente trabalho revelou um predomínio de crianças até 10 anos de idade (82%), sendo que 45% destas crianças tinham menos de um ano de idade. O alto índice de crianças

infectadas por *Shigella* spp. é característico de um quadro endêmico (Shears, 1996, e Kotloff *et al.*, 1999), e provavelmente ocorre devido à vários fatores que influenciam a alimentação infantil, desde a duração do período da amamentação, o peso do recém-nascido, o nível social dos pais, a localização da casa onde residem, e ainda o acesso ao saneamento básico (Medeiros, 2001).

O presente trabalho revelou ainda uma distribuição sazonal da bactéria, característica também muito comum em áreas endêmicas (Shears, 1996). Durante os meses mais quentes do ano (janeiro, fevereiro, março e abril), foram coletadas mais amostras de *Shigella* spp. do que durante os meses mais frios (ver gráfico b da Figura 4.1, para um $p < 0,05$). Esses dados corroboram os dados obtidos por Almeida e colaboradores (1998), que evidenciaram uma maior quantidade de amostras isoladas durante a primavera, na região de São José do Rio Preto. Tais dados analisados em conjunto indicam uma prevalência deste microrganismo durante o período mais quente e úmido do ano, que correspondem aos meses de outubro a abril. Tal fato sugere uma correlação entre as condições ambientais e a disseminação do patógeno. Durante os meses mais quentes, a desidratação causada pela infecção por *Shigella* spp. torna-se mais acentuada devido à própria temperatura do ambiente onde o paciente se encontra. Isto contribui com uma maior procura pelas unidades de emergência, fazendo com que sejam coletadas mais amostras durante este período. Além disso, as temperaturas elevadas na primavera e no verão favorecem a proliferação destes microrganismos.

No presente trabalho foram isoladas 30 amostras de *S. sonnei* e 33 de *S. flexneri*. Apesar de um maior número de amostras de *S. flexneri* terem sido isoladas, as diferenças não foram estatisticamente significativas, quando

analisadas pelo teste Z para duas proporções ($p < 0,05$). Tal fato revela que não existe predominância de nenhuma destas duas “espécies” como causadora de doença diarréica em Ribeirão Preto e região. É interessante ressaltar que Medeiros e colaboradores (2001) mostraram que no período de janeiro de 1994 a dezembro de 1997, ocorreu um predomínio de *S. sonnei* na região de Ribeirão Preto (63,16% dos casos de shigelose). Entretanto, os dados de Almeida *et al.* (1998) indicam a prevalência de *S. flexneri* (85% dos casos de shigelose) na região de São José do Rio Preto, no período de fevereiro de 1992 a janeiro de 1993. Apesar de contraditórios, tais dados são consistentes e o resultado obtido pelo presente trabalho vem ressaltar este aspecto diferencial da distribuição de “espécies” de *Shigella* spp. no Brasil. De acordo com a literatura, *S. sonnei* seria encontrada com maior frequência em países desenvolvidos e *S. flexneri* em países em desenvolvimento (Blaser, 1983; Gomes, 1991; Lima, 1997).

Além das 64 amostras de *Shigella* spp. isoladas no HC, foram também analisadas no presente trabalho seis amostras de *S. dysenteriae* e uma de *S. boydii* isoladas e cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Estas sete amostras foram isoladas nos anos de 1984 a 1996, e não foram incluídas em nenhuma análise estatística mencionada até o momento. O objetivo de se incluir estas amostras no estudo foi o de compará-las com as 64 obtidas na UE para as análises de tipagem molecular, desta maneira podendo se analisar os perfis de “fingerprinting” das quatro “espécies” de *Shigella* spp.

A análise da sensibilidade a antibióticos revelou uma alta incidência de amostras resistentes a sulfonamida (90,4%), tetraciclina (64,4%), ampicilina (48%) e cloranfenicol (16,4%), e uma menor proporção para gentamicina (5,5%), tobramicina (5,5%), amicacina (1,37%) e cefalotina (5,5%). Nenhuma

amostra foi resistente ao ácido nalidíxico ou a cefoxitina. Além disso, foi constatada a emergência de amostras multirresistentes, ou seja, 35,13% das 64 amostras coletadas na Unidade de Emergência de Ribeirão Preto são resistentes a, no mínimo, três classes distintas de antibióticos. Tal fato levanta uma preocupação em relação ao controle do uso de antibióticos por parte dos profissionais da área de saúde de Ribeirão Preto. De acordo com os resultados, o uso de sulfonamida, tetraciclina e ampicilina poderia ser considerado como ineficiente para o tratamento de shigelose na região de Ribeirão Preto, pois mais de 50% das amostras isoladas são resistentes a estes agentes antimicrobianos.

Esse aumento da resistência aos antibióticos de uso mais comuns apresenta um dilema no tratamento de infecções causadas por *Shigella* spp. Foram reportados na literatura poucos casos de resistência significativa a classe de antibióticos das quinolonas (Ashkenazi, 2003), portanto, poderia se sugerir o uso preferencial desta classe de antibióticos para o tratamento dos casos de shigelose em nossa região. Entretanto, vale ressaltar que ciprofloxacina e norfloxacina são fluorquinolonas nocivas para crianças, adolescentes e mulheres grávidas, pois afetam o desenvolvimento do tecido cartilaginoso (Tortora, 2000). Como a maioria dos pacientes contaminados é de crianças de até 10 anos de idade, tem sido sugerido o uso de ácido nalidíxico como principal agente antimicrobiano a ser adotado como medida profilática, uma vez que a sensibilidade a este antibiótico foi testada e nenhuma amostra analisada no presente trabalho apresentou resistência ao mesmo, e ele não influencia na formação cartilaginosa do hospedeiro.

O tratamento com antibióticos é muito importante para a diminuição da febre e duração dos sintomas de diarreia causados pela infecção por *Shigella*

spp, e importante também na diminuição dos riscos letais decorrentes de uma infecção em indivíduos com menos de 10 anos de idade. Um outro ponto importante que deve ser levado em conta é que o uso de antibióticos reduz a eliminação do patógeno no meio ambiente através das fezes dos pacientes infectados, o que diminui significativamente a disseminação da doença (Ashkenazi *et al.*, 2003). No entanto, o tratamento deve ser feito de forma eficaz, no sentido de se eliminar todos os microrganismos que estejam infectando o paciente. Portanto, a dosagem e o tempo de tratamento devem ser adequados, para evitar que formas resistentes do microrganismo venham a ser selecionadas.

Devido ao uso exacerbado e descontrolado de antibióticos por parte da população, e dos riscos que a adoção desta medida vem causar no sentido de propiciar a seleção de linhagens resistentes às drogas mais utilizadas, a melhor forma de tratamento ainda é a prevenção, que só é possível ao adotar-se medidas eficazes para a melhoria das condições de saneamento básico para as populações mais pobres. Como *Shigella* spp é transmitida por contato pessoa a pessoa, uma melhoria na qualidade da água e coleta de esgoto para esta população seria suficiente para se evitar uma maior disseminação da doença. Além disso, um maior cuidado com a higiene pessoal, como, por exemplo, a adoção efetiva da lavagem das mãos, mostrou resultado na redução do contágio desse microrganismo (Khan, 1982, *in* Shears, 1996).

Desde 1960, pesquisadores começaram a relatar a presença de amostras multirresistentes de *Shigella* spp. (Shears, 1996), e a partir de então, uma porcentagem cada vez maior de microrganismos foi isolada apresentando resistência a múltiplos antibióticos. No presente trabalho, foi constatado que a maior parte dos isolados multirresistentes apresentaram resistência a

ampicilina, sulfonamida e tetraciclina (41,7%) ou ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida e tetraciclina (33,34%). Tal padrão tem sido descrito desde 1988 para *S. flexneri*, e provavelmente corresponde a um marcador de resistência contido em um plasmídeo (Shears, 1996). Muitos genes de resistência a antibióticos, algumas vezes associados a genes de virulência, são carregados por plasmídeos que são transferidos horizontalmente entre diferentes populações bacterianas, favorecendo a disseminação destes marcadores de resistência a antibióticos entre diferentes microrganismos. Essa troca de material genético pode estar ocorrendo tanto no organismo do hospedeiro, quanto no ambiente, em reservatórios de águas poluídas, fato este que é muito relevante em países tropicais onde patógenos são livremente liberados no ambiente através da via oral-fecal (Shears, 1993), e poderia ser um dos fatores responsáveis pelo surgimento de cepas resistentes na região de Ribeirão Preto. Essa disseminação tem sido considerada um dos principais problemas dos dias de hoje, pois o aumento freqüente de linhagens resistentes a diferentes antibióticos, e ainda as linhagens multirresistentes, tem tornado algumas infecções difíceis de se tratar através dos métodos terapêuticos mais convencionais (Martínez & Baquero, 2002).

Além dos plasmídeos, outros elementos móveis poderiam ser responsáveis por estes fenótipos resistentes nas amostras estudadas. Um elemento móvel muito importante neste aspecto é o transposon, que é uma seqüência de DNA que possui uma região que codifica uma transposase, permitindo a inserção e excisão deste elemento. As bactérias possuem muitas destas seqüências de inserção espalhadas pelo genoma, e muitas vezes elas podem se integrar a plasmídeos e serem transferidas para outras bactérias, disseminando, desta forma, o fenótipo resistente (Normark & Normark, 2002).

Outros exemplos de elementos móveis são os fagos, que são muito importantes na estrutura de “ilhas de patogenicidade”, revelando uma relação existente entre a resistência a antibióticos e a virulência de cepas endêmicas (Martínez & Baquero, 2002) e integrons, que são cassetes gênicos que podem conter mais de um gene sob a regulação de um único sítio promotor e uma integrase, que medeia a inserção desta seqüência no DNA alvo, permitindo assim, a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre a população bacteriana. Acredita-se que a transferência horizontal por meio dos integrons seja uma das principais formas de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre as bactérias Gram-negativas (Martínez & Baquero, 2002).

Além da transferência horizontal, os genes de resistência a antibióticos podem surgir nas populações bacterianas por recombinação e mutações aleatórias no genoma. Essas mutações são muito freqüentes e evidenciadas quando se encontram no genoma regiões com múltiplos genes de resistência formando uma “ilha de resistência”, muito semelhante às “ilhas de patogenicidade” (Martínez & Baquero, 2002). Recentemente, um mecanismo muito eficiente de resistência a antibióticos tem sido descrito (Martínez & Baquero, 2002). Esse mecanismo é denominado bomba de efluxo (“efflux pumps”). Essas bombas ocorrem naturalmente nas bactérias e são responsáveis pela eliminação de uma ampla gama de substâncias, incluindo antibióticos, solventes, tinturas, e moléculas sinalizadoras pertencentes ao sistema de “quorum-sensing”. A presença destas bombas de efluxo, na maioria das vezes, é relacionada a um aumento na virulência bacteriana, e ainda na característica de multirresistência das mesmas, uma vez que é quase, via de regra, que esses sistemas de transporte eliminem, sem restrição, diferentes

classes de agentes antimicrobianos ao mesmo tempo, como, por exemplo, eritromicinas, quinolonas e beta-lactâmicos (Martínez & Baquero, 2002). Tal fato poderia estar acontecendo com as amostras multirresistentes da região de Ribeirão Preto.

É importante ressaltar que todas as mutações e recombinações, incluindo as transferências horizontais, estão sujeitas às pressões seletivas proporcionadas pelos próprios antibióticos. O surgimento de linhagens resistentes a antibióticos é um fato recente na história evolutiva desses microrganismos, ocorrendo a pelo menos 50 anos, e ela só aconteceu devido ao uso descontrolado desses medicamentos, que proporcionou uma seleção das linhagens mais resistentes, em detrimento das sensíveis. Um fato importante que deve ser levado em consideração é que a aquisição de um novo material genético tem sempre um custo para a bactéria, ou seja, esse DNA com um ou mais genes de resistência provavelmente poderá afetar o “fitness genético” do microrganismo, no sentido de “obrigá-lo” a ter um modo de vida completamente diferente, ou ainda um custo na obtenção de energia, necessária para manter esses novos genes (Martínez & Baquero, 2002). Entretanto, este custo é rapidamente balanceado devido à alta plasticidade do genoma bacteriano, permitindo a ocorrência de mutações compensatórias.

Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade aos antibióticos foram utilizados na construção de um dendrograma de similaridade genética baseado na interpretação das categorias, resistente e sensível, no sentido de se fazer uma primeira abordagem para a tipagem dos microrganismos estudados. O dendrograma obtido (Figura 4.4) revelou 16 grupos distintos. Nove destes grupos foram compostos apenas por uma amostra, sendo considerados táxons terminais isolados. Os outros sete ramos do dendrograma foram constituídos

por “clusters” maiores, agrupando de seis a 23 amostras diferentes, com 100% de similaridade entre elas. É importante ressaltar que dentro destes grupos com coeficiente de similaridade igual a 1,00, amostras pertencentes a diferentes “espécies” agrupavam-se juntas, com alto grau de similaridade. Deste modo, apesar do índice de discriminação deste método ser aparentemente elevado, conforme foi demonstrado através dos cálculos matemáticos (índice de discriminação igual a 0,8489), a capacidade do método em diferenciar as quatro “espécies” de *Shigella* spp. analisadas não foi satisfatória. No entanto, esta análise revela uma grande variação na sensibilidade aos antibióticos, o que provavelmente pode estar relacionado com a transferência horizontal de genes de resistência entre as amostras.

A tipagem de microrganismos baseada em características fenotípicas, principalmente relacionada à resistência a determinados antibióticos tem sido discutida ao longo dos anos por diferentes pesquisadores (Tenover, 1994). As características de resistência a antibióticos são muito lábeis e muitas vezes dependentes de elementos genéticos móveis e intercambiáveis dentro das populações bacterianas, como, por exemplo, os plasmídeos que carregam genes de resistência. Tal fato diminui a reprodutibilidade desta técnica na tipagem, pois tais marcadores de resistência podem ser perdidos ou adquiridos, mascarando o real polimorfismo que eventualmente existiria na população bacteriana estudada. Tais características geralmente não refletem a real similaridade genética entre diferentes isolados. Entretanto, devido ao fato de testes de sensibilidade a antibióticos serem relativamente baratos e fáceis de serem realizados, tal metodologia poderia ser empregada como um levantamento inicial para se determinar a relação existente entre diferentes amostras em análises epidemiológicas ou no estudo de amostras endêmicas.

Amostras multirresistentes podem ser selecionadas positivamente e representarem uma boa parte das amostras causadoras de infecções endêmicas. O dendrograma da Figura 4.4 mostra que as amostras multirresistentes (amostras marcadas com asteriscos*) estão agrupadas, sugerindo que elas tenham sido originadas a partir de um mesmo clone, ou seja, na região de Ribeirão Preto, provavelmente esteja ocorrendo uma origem clonal destas amostras multirresistentes.

A primeira metodologia de tipagem molecular utilizada no presente trabalho foi a ribotipagem. A ribotipagem foi primeiramente descrita na década de 80, por Grimont e Grimont (1986), e vem sendo utilizada desde então como uma importante ferramenta na tipagem de amostras bacterianas em estudos de taxonomia, evolução molecular e epidemiologia bacteriana (Faruque *et al.*, 1992; Preston *et al.*, 1994; Hinojosa-Ahumada *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1996; Bingen *et al.*, 1994), sendo muito bem aceita na tipagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, devido ao grande número de operons de rRNA (Wu & Della-Latta, 2002).

Através da análise por ribotipagem das 75 amostras avaliadas no presente trabalho, foi observado um padrão de bandas, obtido a partir do tratamento destas com a enzima de restrição *HindIII*, seguida da hibridação com uma sonda marcada com fluorescência, constituída pela seqüência do *operon* do RNA ribossômico de *E. coli*. Desta forma, cada padrão de bandas distinto foi considerado um ribotipo diferente. Após todas as 75 amostras terem sido avaliadas por este método, chegou-se à conclusão que na população bacteriana estudada existiam sete ribotipos distintos, divididos da seguinte maneira: *S. flexneri* constituída por dois ribotipos (RTI e RTII), *S. sonnei* também por dois (RTIII e RTIV) e *S. boydii* apresentando apenas um ribotipo

(RTVII). Todas as seis amostras de *S. dysenteriae* cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz apresentaram o mesmo ribotipo (RTV). No entanto, a linhagem padrão de *S. dysenteriae* SD3818T apresentou um padrão diferente das demais (RTVI). Essa foi a única linhagem padrão que se enquadrou em um grupo diferente do que o das amostras coletadas na região. As amostras padrões de *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* incluíram-se nos mesmos grupos que continham amostras regionais (respectivamente RTI, RTIII e RTVII).

O presente trabalho apresentou, portanto, sete ribotipos que incluíram as 75 amostras. A obtenção de poucos ribotipos entre as amostras estudadas é freqüentemente relatada na literatura. Hinojosa-Ahumada e colaboradores (1991) relataram a obtenção de nove ribotipos diferentes de *S. sonnei* de uma população de 100 amostras estudadas nos Estados Unidos, sendo que 89% das amostras pertenciam a dois únicos ribotipos mais predominantes. Nastasi *et al.* (1993) identificaram 13 ribotipos distintos entre 299 de *S. sonnei* isoladas na França, Itália e Suíça. Entretanto, 95% destas amostras correspondiam a apenas quatro ribotipos mais freqüentes. E ainda, Faruque e colaboradores (1992) identificaram 11 ribotipos diferentes na ribotipagem de 72 isolados de *S. flexneri* em Bangladesh, sendo 63,88% pertencendo a três ribotipos principais.

O padrão de bandas obtido pela ribotipagem permitiu a construção de um dendrograma de similaridade genética que pode ser verificado na Figura 4.8. O padrão homogêneo dos perfis de ribotipos verificado nas amostras bacterianas analisadas é refletido na própria constituição do dendrograma. Neste dendrograma são observados sete "clusters", cada um correspondente a um ribotipo diferente, mostrando existir na população um baixo polimorfismo genético. O grau de discriminação calculado para esta técnica foi o mais baixo obtido no presente trabalho (índice de discriminação igual a 0,7842), resultado

desta limitada quantidade de ribotipos diferentes que foram gerados. A técnica da ribotipagem tem uma alta reprodutibilidade, uma vez que ao se realizarem duas ou três reações distintas para a mesma amostra, obtem-se o mesmo resultado (dados não mostrados).

A metodologia da ribotipagem se mostrou muito eficiente na discriminação das quatro “espécies” de *Shigella* spp. No dendrograma de similaridade genética é possível verificar a formação de dois grupos principais, denominados A e B, com aproximadamente 31,25% de similaridade entre eles. O grupo A seria formado por *S. flexneri* e *S. sonnei*, com similaridade de 49,25% entre elas, e o grupo B constituído de *S. dysenteriae* e *S. boydii*, com 53,75% de similaridade. Tal resultado revela uma característica muito importante no grupo *Shigella* spp. *S. flexneri* e *S. sonnei* apresentam um maior grau de similaridade e seriam mais relacionadas, sugerindo maiores semelhanças fenotípicas entre si do que estas em relação a *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Uma análise semelhante foi descrita por Rolland e colaboradores (1998), mostrando que *S. flexneri* e *S. sonnei* eram claramente distinguíveis de *S. dysenteriae* e *S. boydii* através de uma análise de RFLP usando sonda para rRNA (ribotipagem).

No entanto, a técnica da ribotipagem não foi muito eficiente em relação a revelar o polimorfismo existente na população bacteriana testada. O resultado da análise dos ribotipos obtidos mostrou um padrão de bandas muito homogêneo, com a formação de “clusters” contendo muitas amostras dentro de um mesmo ribotipo nos dendrogramas, dificultando uma análise mais detalhada das relações de similaridade existentes entre as amostras coletadas, particularmente aquelas pertencentes à mesma “espécie”. Entretanto, ficou bem evidente que a diferença no padrão de bandas dos ribotipos entre as

quatro “espécies” de *Shigella* spp é maior do que entre isolados de uma mesma espécie, sendo possível, desta forma, diferenciar as “espécies” pela análise do ribotipo. Esta última observação pode se aplicar não somente a amostras locais, como também a amostras de outras regiões, uma vez que as amostras padrões de *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* apresentaram perfis de bandas semelhantes às amostras locais. Entretanto, devido ao fato da amostra padrão de *S. dysenteriae* apresentar um ribotipo diferente das locais, sugere-se que um estudo mais aprofundado deva ser realizado em cada região onde se pretende fazer análises de ribotipos, pois acredita-se que a análise de amostras provenientes de outras regiões possa resultar em padrões diferentes de bandas. De qualquer forma, foi concluído nesse trabalho que a ribotipagem seria um método eficiente para identificar amostras locais de *Shigella* spp., muito mais eficiente do que a tipagem por categorias de resistência a antibióticos, uma vez que foi possível fazer uma distinção entre as quatro “espécies” de *Shigella* spp. Mais uma vez, ficou evidenciado pela análise do dendrograma (Figura 4.8) o agrupamento das amostras multirresistentes, sendo que neste caso a grande maioria das amostras MR de *S. flexneri* ficaram no ribotipo RTI. Este dado vem contribuir com a hipótese de que esteja ocorrendo uma origem clonal destas amostras multirresistentes.

O método de tipagem molecular utilizado em seguida foi a reação de PCR baseada nas seqüências repetitivas REP. Tal metodologia mostrou-se muito eficiente em revelar o polimorfismo existente na população bacteriana estudada. Foi possível observar a quantidade de 9 a 14 bandas, cujos padrões variavam muito de uma amostra para outra. Tal fato permitiu a construção de um dendrograma (Figura 4.10) menos uniforme e com menor quantidade de grupos com 100% de similaridade, do que os obtidos para a ribotipagem e para

a tipagem baseada no antibiograma. Tal fato permite especular que o REP-PCR seria uma metodologia mais eficiente do que a ribotipagem e a tipagem por antibiograma em termos de se aproximar da real diversidade genética de determinada população.

O dendrograma de REP-PCR permite observar que a população estudada apresenta uma grande diversidade em seu genoma, baseada na quantidade e posição das seqüências aleatórias REP. A análise do dendrograma nos permite visualizar sete grupos principais, denominados de A a G. O grupo A e o grupo B são constituídos praticamente de *S. sonnei* e *S. flexneri*, respectivamente, compartilhando um coeficiente de similaridade aproximadamente igual a 71%. Ao se comparar o grupo formado por *S. flexneri* e *S. sonnei* em relação aos outros ramos do dendrograma, conclui-se que estas duas “espécies” de *Shigella* spp. estariam mais relacionadas entre si do que elas em relação à *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Esta relação foi também observada na análise do dendrograma da ribotipagem, o que aumenta a evidência de que tal semelhança seja uma característica recorrente para estas duas “espécies” citadas. A análise da semelhança entre as diferentes “espécies” utilizando o marcador REP é um fato inédito na literatura, e vem mostrar a importância desta metodologia no estudo das relações genéticas existentes dentro de um determinado gênero bacteriano.

A análise do dendrograma permite ainda fazer mais algumas relações de similaridade entre as amostras estudadas. Existem algumas amostras de *S. sonnei* (SS11, SS16 e a amostra padrão SSB5514) que se agruparam fora do grupo principal formado por esta “espécie”, o grupo A. A amostra padrão se agrupou junto com duas amostras de *S. boydii* (grupo D, 71% de similaridade), e as outras duas amostras formaram um grupo isolado, com baixo coeficiente

de similaridade em relação às demais amostras (grupo G, 62% de similaridade). O mesmo foi observado para a amostra de *S. flexneri* SF43, que se encontra formando um grupo com a amostra padrão de *S. dysenteriae* SD3818T (grupo C, 75% de similaridade). Tal fato aconteceu provavelmente devido a uma discrepância em relação ao padrão de bandas destas amostras comparado com o padrão das demais amostras da mesma “espécie”. Por meio da técnica de REP-PCR, observou-se tanto uma menor quantidade de bandas ou uma quantidade exagerada de bandas para estas amostras, fazendo com que elas ficassem agrupadas fora de seus “clusters” característicos. Isso pode acontecer devido ao próprio caráter destas seqüências repetitivas serem aleatórias e de número variado. Algumas amostras bacterianas podem ter menos ou mais seqüências do que outras, permitindo que ocorram diferenças marcantes entre os padrões de bandas gerados pela técnica.

Mais uma observação que pode ser feita ao se analisar o dendrograma é a formação de um grupo de *S. dysenteriae* composto por todas as amostras desta “espécie” (grupo E, 67% de similaridade), com exceção da amostra padrão. Neste grupo ficou excluída a amostra padrão de *S. dysenteriae*. É interessante notar que a amostra padrão *S. dysenteriae* SD3818T, assim como a amostra padrão *S. sonnei* SSB5514, não se agruparam no “cluster” principal de ambas “espécies”. Tal fato ocorre provavelmente devido às diferenças existentes entre populações distintas de bactérias. Essas amostras-padrão foram isoladas em outros países e, portanto, apresentam um padrão de distribuição das seqüências repetitivas REP tão distinto que acaba distanciando-as das amostras locais, fazendo com que elas se agrupassem em grupos diferentes. As três amostras de *S. boydii* não formaram nenhum grupo em si, porém duas delas (amostra padrão SBS605 e SB03) apresentaram

maior similaridade entre si (72%) do que estas em relação à amostra *S. boydii* SB8135.

Ao se analisar os padrões de bandas obtidos por REP-PCR é possível concluir que na população bacteriana estudada não existe uma amostra que possa ser considerada epidêmica, dado o grau de dissimilaridade genética observado entre as amostras. Por meio desta observação fica claro que o presente estudo trata de amostras endêmicas isoladas ao longo do ano de 1999 na região de Ribeirão Preto, não tendo ocorrido nenhuma epidemia de *Shigella* spp. nesta região. Uma epidemia consiste na rápida disseminação de uma certa linhagem de patógeno em um curto período de tempo. Geralmente, em se tratando de epidemia, as amostras de diferentes pacientes estariam geneticamente mais relacionadas do que em casos endêmicos (Normark & Normark, 2002).

Os dados da procedência de cada paciente infectado foram analisados frente ao dendrograma de REP-PCR com o objetivo de se traçar alguma relação entre a similaridade e o local de origem das bactérias estudadas. A hipótese era de que amostras provenientes da mesma cidade apresentariam um maior grau de similaridade genética. No entanto, tal fato não foi observado no presente estudo (dados não mostrados). As amostras de uma mesma cidade muitas vezes encontravam-se em “clusters” diferentes, e ainda não muito raramente, duas amostras de cidades distintas apresentavam 100% de similaridade entre si. Tal fato se dá provavelmente devido ao constante intercâmbio existente entre a população humana destas cidades, e pelo fato de Ribeirão Preto ser uma metrópole regional, atraindo muitas pessoas de cidades vizinhas, fazendo com que não exista um isolamento de amostras em determinados locais a ponto delas formarem uma linhagem ou subtipo distinto.

Uma última observação que pode ser obtida pela análise do dendrograma de REP-PCR é que as amostras resistentes a três classes distintas de antibióticos, ou seja, as amostras multirresistentes de *S. flexneri*, encontram-se praticamente agrupadas em “clusters” com aproximadamente 80% e 90% de similaridade (tais amostras estão marcadas com asteriscos* na Figura 4.10). Estes dados sugerem uma possível origem clonal para tais amostras e são indicativos da existência de pressão seletiva no sentido da manutenção destes marcadores de resistência. O quadro que emerge de tal resultado é que determinado clone bacteriano tenha adquirido genes (plasmídeos ou bombas de efluxo) ou sofrido mutações que levaram a aquisição de resistência a determinadas drogas. Este clone foi selecionado pelo uso indiscriminado de antibióticos por parte da população humana e representa hoje um clone predominante dentre as amostras endêmicas de *S. flexneri*. Os resultados ainda sugerem “rounds” sucessivos de aquisição e seleção de novas marcas de resistência a antibióticos gerando clones multirresistentes. O mesmo não pode ser observado para outras “espécies” de *Shigella* spp., devido ao baixo número de amostras multirresistentes das mesmas, o que torna a análise mascarada pelo baixo número amostral. Ou seja, as amostras de *S. dysenteriae* e *S. sonnei* multirresistentes encontram-se distribuídas pelo dendrograma.

O índice de discriminação para esta técnica foi de 0,9917, que é considerado um índice relativamente alto e com grande aceitação no sentido de revelar o polimorfismo existente dentro de uma população em estudos epidemiológicos e endêmicos (Hunter & Gaston, 1988), sugerindo que a metodologia do REP-PCR seria uma ferramenta eficiente na discriminação das quatro “espécies” de *Shigella* spp. estudadas.

A tipagem molecular por PCR utilizando iniciadores para as seqüências ERIC também se mostrou bastante eficaz em revelar o polimorfismo genético existente na população bacteriana estudada. Foram observadas de 13 a 20 bandas nos géis de agarose analisados, revelando um padrão distinto entre as quatro “espécies” estudadas, assim como uma variação deste polimorfismo entre amostras dentro das diferentes “espécies” de *Shigella* spp. O dendrograma obtido por ERIC-PCR (Figura 4.12) também revelou um menor grau de uniformidade entre os padrões de bandas dos isolados, revelando uma menor quantidade de grupos com 100% de similaridade em comparação aos obtidos para a ribotipagem e para a tipagem baseada no antibiograma. Tal fato permite especular que o ERIC-PCR, assim como o REP-PCR, também seria uma metodologia mais eficiente que a ribotipagem e o antibiograma em termos de se aproximar mais da real diversidade genética da população estudada.

A análise do dendrograma nos permite visualizar quatro grupos principais, denominados de A a D. O grupo A, com 65% de similaridade, é constituído exclusivamente de *S. flexneri*, com exceção da amostra de *S. sonnei* SS72, que se inseriu neste grupo por apresentar uma maior similaridade com a amostra padrão *S. flexneri* SF2457T (coeficiente igual a 70,5%). Esse fato revela que a amostra padrão de *S. flexneri* SF2457T, apesar de se encontrar dentro do grupo A, que é formado praticamente por todas as amostras locais de *S. flexneri*, apresenta características distintas, que permitem agrupá-la em um ramo distante dentro deste grupo, com o menor coeficiente de similaridade em relação às demais (65%), e apresentando, inclusive, um maior grau de similaridade desta com relação à amostra de *S. sonnei* SS72 do que com as demais *S. flexneri*.

O grupo B ficou formado apenas por amostras de *S. dysenteriae* isoladas pelo Instituto Adolfo Lutz, e, conforme foi visto para o dendrograma de REP, este grupo com as amostras locais de *S. dysenteriae* excluiu a amostra padrão *S. dysenteriae* SD3818T. Outra característica relevante neste “cluster” B é o agrupamento da amostra de *S. boydii* SB8135, que também é proveniente do Instituto Adolfo Lutz. O dendrograma do REP-PCR também mostrou que essa amostra se encontra compartilhando maior similaridade com as amostras locais de *S. dysenteriae*, porém com um coeficiente de similaridade relativamente menor (61% para o REP contra 68% do ERIC). O agrupamento desta amostra de *S. boydii* no grupo das amostras locais de *S. dysenteriae* provavelmente seria um reflexo da similaridade genética que existe entre estas, sugerindo uma relação de parentesco entre elas, relacionado com o padrão de distribuição das seqüências repetitivas ERIC e REP.

O grupo C ficou constituído exclusivamente por *S. sonnei*, e o “cluster” D abrigou amostras das quatro “espécie” analisadas, com exceção de *S. flexneri*. Neste grupo D encontram-se as amostras padrões de *S. boydii* e *S. dysenteriae*. É válido lembrar que a amostra padrão de *S. dysenteriae* no dendrograma do REP-PCR também foi agrupada fora de seu grupo principal, refletindo a diferença do padrão de bandas obtido ao se comparar amostras locais com amostras de diferentes regiões.

Ao se analisar os padrões de bandas obtidos através do ERIC-PCR, é possível concluir que dentro da população bacteriana estudada não existe uma amostra que possa ser considerada amostra epidêmica, conforme já havia sido detectado através da análise do dendrograma do REP-PCR. Através desta observação é possível reforçar a idéia de que o presente estudo trata de amostras endêmicas, não representando nenhuma epidemia de *Shigella* spp.

na região de Ribeirão Preto. Os dados da procedência de cada paciente infectado também foram inseridos no dendrograma de ERIC-PCR com o objetivo de se traçar alguma relação entre a similaridade e o local de origem das bactérias estudadas. Mais uma vez não se observou nenhuma relação.

A análise do dendrograma de ERIC-PCR também mostrou que as amostras multirresistentes de *S. flexneri* encontram-se praticamente agrupadas em grupos com aproximadamente 80% de similaridade, conforme constatado para o REP-PCR (tais amostras estão marcadas com asteriscos* na Figura 4.12), reforçando a hipótese de uma origem clonal destas amostras.

A amostra *S. flexneri* SF34 não se agrupou com nenhum dos “clusters” mencionados acima, encontrando-se formando um ramo distinto, com 46% de similaridade em relação ao restante das amostras. Tal fato ocorreu devido ao padrão de bandas obtido para esta amostra por meio do ERIC-PCR ter sido muito diferente dos demais, com um número muito reduzido de fragmentos (seis fragmentos ao todo). Apesar desta amostra estar isolada em um ramo único e “distante” geneticamente das demais, não significa que ela seja geneticamente diferente das outras amostras de *Shigella* spp., pois no dendrograma de REP-PCR ela se encontra dentro do grupo formado pelas demais *S. flexneri* (grupo B). Esse resultado demonstra que a adoção de uma única metodologia de tipagem pode revelar um resultado que nem sempre condiz com a realidade (Olive & Bean, 1999; Lima *et al.*, 1997). A sugestão, portanto, é a utilização de pelo menos duas técnicas de tipagem distintas, conforme o presente trabalho demonstrou.

Ao se comparar o grupo formado por *S. flexneri* e *S. sonnei* (grupo A mais grupo C) em relação aos outros ramos do dendrograma, obtém-se um resultado diferente do observado com o REP-PCR e com a ribotipagem.

Através do ERIC-PCR, conclui-se que as amostras de *S. flexneri* e *S. dysenteriae* estariam mais relacionadas entre si (similaridade igual a 59%) do que elas em relação à *S. sonnei* e *S. boydii*, devido a maior proximidade entre os grupos A e B. Entretanto, a similaridade entre *S. flexneri* e *S. sonnei* é estimada em 58%, diferença não estatisticamente significativa se comparada com a porcentagem anterior (59%). Portanto, através de ERIC-PCR não fica claro qual seria a relação de similaridade entre as quatro “espécies” estudadas.

Para verificar se a junção dos resultados obtidos com as duas técnicas de Rep-PCR pudesse aumentar o seu poder discriminatório, foi construído um dendrograma consenso, somando as características do REP e do ERIC-PCR (Figura 4.13).

O dendrograma consenso revelou uma divisão das amostras em seis grupos distintos, denominados de A a F. O grupo A ficou constituído somente de amostras de *S. sonnei*, e o grupo B somente por amostras de *S. flexneri*, com exceção da amostra SS46 de *S. sonnei*, que não se encontra no grupo A por não ter sido possível realizar a tipagem dela por REP-PCR. Tal fato pôde ter contribuído com seu agrupamento dentro do “cluster” de *S. flexneri*, devido à falta de informação dos dados do REP, uma vez que esse dendrograma é baseado em um consenso formado pela união dos padrões gerados por REP e ERIC-PCR. O coeficiente de similaridade que corresponde ao agrupamento dos “cluster” A e B é de 72%. Esta análise permite verificar o que já havia sido postulado através da análise do REP-PCR, que *S. flexneri* e *S. sonnei* são mais relacionadas entre si do que estas em relação às outras duas “espécies” de *Shigella* spp.

No dendrograma consenso é possível observar ainda a formação do ramo C composto apenas pela amostra de *S. sonnei* SS72, que mais uma vez

encontra-se fora de seu grupo padrão (que seria o “cluster” A). Tal fato havia sido observado anteriormente através do ERIC-PCR, porém, desta vez esta amostra não apresenta um alto coeficiente de similaridade com a amostra padrão *S. flexneri* SF2457T, como havia sido detectado anteriormente. O seu índice de similaridade em relação ao restante das amostras de *S. flexneri* é de aproximadamente 71%. Tal fato permite concluir que, apesar do dendrograma consenso ser eficiente em aumentar o índice de discriminação entre as amostras testadas, é evidente que amostras que em um determinado momento encontravam-se fora de seus grupos característicos devido a um padrão de bandas diferencial e atípico continuam sendo agrupadas em ramos distintos do “cluster” formado pela maior parte das amostras de tal “espécie”.

As amostras de *S. dysenteriae* e *S. boydii* isoladas pelo Instituto Adolfo Lutz foram agrupadas em um único “cluster” (grupo F), conforme havia sido observado através da análise dos dendrogramas de REP e ERIC sozinhos. Os grupos D e E foram formados por amostras de *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*, incluindo aí as amostras-padrão *S. dysenteriae* SD3818T e *S. boydii* SBBS605, como havia sido verificado anteriormente.

Portanto, a construção do dendrograma consenso aumentou a capacidade discriminatória desses métodos, revelando que realmente existe um alto polimorfismo na população bacteriana estudada, em relação às seqüências REP e ERIC, e ainda mostrou as relações existentes entre a similaridade genética das quatro “espécies” de *Shigella* spp., indicando um maior parentesco entre *S. flexneri* e *S. sonnei*, como foi anteriormente relatado na literatura (Rolland *et al.*, 1998; Pupo *et al.*, 2000; Lan & Reeves, 2002; Jin *et al.*, 2002; Goldberg *et al.*, 2003).

O índice de discriminação calculado para o ERIC-PCR foi um dos mais elevados obtidos na presente análise, calculado em 0,9971, revelando tal metodologia como uma das mais eficientes na discriminação das amostras estudadas. O índice de discriminação para o dendrograma consenso foi igual a 1,00. Tal valor indica que a capacidade de discriminação deste método seria incontestável. Entretanto, o cálculo deste índice parte da idéia de que quanto maior é a quantidade de “clusters” com 100% de similaridade obtida, menor é o grau de discriminação do método. Como no dendrograma consenso não existiu nenhum grupo formado com 100% de similaridade, o índice atingiu seu valor máximo. Este índice, no entanto, não revela quão eficiente é o poder de cada método em discriminar amostras pertencentes a classes diferentes, como, por exemplo, “espécies” diferentes de *Shigella* spp., por não levar em consideração as diferenças das classes em seu cálculo. Ele apenas reflete a variação existente entre diferentes perfis na população estudada, sendo talvez mais pertinente de ser utilizado para análises dentro de amostras de uma única “espécie” apenas.

De um modo geral, todos os métodos de tipagem molecular utilizados no presente trabalho revelaram que *S. flexneri* e *S. sonnei* estariam mais relacionadas entre si do que elas em relação à *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Ou seja, *S. flexneri* e *S. sonnei* possuem mais características em comum entre si do que em relação a outras “espécies” do gênero *Shigella* spp. A análise da semelhança entre as diferentes “espécies” utilizando os marcadores REP e ERIC é um fato inédito na literatura, e vem mostrar a importância desta metodologia no estudo das relações genéticas existentes dentro de um determinado gênero bacteriano.

Os métodos moleculares se mostraram eficientes também na distinção entre as quatro “espécies” de *Shigella* spp. Entretanto, os métodos de tipagem baseado em seqüências repetitivas (Rep-PCR) se mostraram mais eficientes do que a ribotipagem em revelar o polimorfismo existente na população bacteriana estudada. Como essas seqüências repetitivas são encontradas entre genes que muitas vezes são flanqueados por regiões que não codificam nenhum RNA (Versalovic *et al.*, 1991; Lupski & Weinstock, 1992) e, teoricamente, não sofrem uma pressão seletiva muito forte, podendo acumular mutações silenciosas, espera-se que entre amostras bacterianas diferentes ocorram diferenças nas seqüências de nucleotídeos entre as regiões repetitivas e mesmo na posição e quantidade destas seqüências, gerando este grande polimorfismo quanto ao número e posição destas seqüências na população bacteriana.

É válido lembrar que apenas uma região específica do DNA genômico dessas bactérias está sendo analisada através da amplificação por PCR. Portanto, observamos o polimorfismo de uma porção do genoma e não do genoma como um todo. O limite para o tamanho do fragmento amplificado pela reação de PCR, nas condições utilizadas, é de aproximadamente 3 kb, isto é, uma pequena fração do DNA bacteriano. Tal fato pode vir a explicar o posicionamento de algumas amostras fora de seus “clusters” principais, conforme foi observado tanto no REP quanto no ERIC-PCR para as amostras *S. sonnei* SS72, SS11, SS16 e *S. flexneri* SF34.

A análise do perfil de bandas obtido através do ERIC-PCR revelou a presença de um fragmento de aproximadamente 1200 pares de bases, ocorrendo em todas as amostras das quatro “espécies” de *Shigella* spp. testadas. Para verificar se essa banda corresponderia à mesma região do

genoma da bactéria, foram escolhidas duas amostras aleatoriamente para serem submetidas ao sequenciamento automático. O fragmento conservado da amostra de *S. flexneri* SF43 e *S. sonnei* SS52 foi extraído do gel de agarose e sua seqüência de nucleotídeos foi obtida por sequenciamento.

Através do programa ClustalW, as duas seqüências foram comparadas em termos de similaridade, e o resultado desta comparação mostrou que correspondiam à mesma região do genoma, compartilhando pelo menos 50% de similaridade na constituição de seus nucleotídeos.

Após tais seqüências serem submetidas ao banco de dados BLAST, verificou-se que a seqüência SF43 (457 bases) correspondia a região dos nucleotídeos 160870 a 161317 de *S. flexneri* 2a linhagem 2457T (referência AE016983.1 – GenBank) e região 9790 a 10029 de *S. flexneri* 2a linhagem 301 (referência AE015176.1 – GenBank), regiões estas que não contêm nenhuma ORF (“open reading frame”) conhecida. Sendo correspondente, portanto, a uma parte do genoma de *S. flexneri* que não continha nenhum gene predito. A seqüência SS52 (126 bases), por sua vez, mostrou corresponder a região de nucleotídeos 160816 a 160924 de *S. flexneri* 2a linhagem 2457T (referência AE016983.1 - GenBank) e região 9736 a 9844 de *S. flexneri* 2a linhagem 301 (referência AE015176.1 – GenBank). Ambas as regiões também não relacionadas a nenhuma ORF conhecida. A comparação dos resultados obtidos através do BLAST para SF43 e SS52 sugere que a região relativa ao fragmento conservado do ERIC-PCR é a mesma para as duas amostras de *Shigella* spp. analisadas. Isso fica evidenciado ao verificar que as regiões dos nucleotídeos reveladas pelo BLAST se sobrepõem, tanto para a linhagem 2457T (160870 a 161317 para SF43 e 160816 a 160924 para SS52) quanto para a linhagem 301 (9790 a 10029 para SF43 e 9736 a 9844 para SS52).

É interessante notar que embora o fragmento SS52 foi originalmente isolado de *S. sonnei*; através do BLAST, ele mostrou ter similaridade a seqüências de *S. flexneri*. Tal fato provavelmente ocorreu devido a dois fatores principais: a linhagem padrão de *S. sonnei* ainda não foi completamente seqüenciada, portanto, no GenBank ainda não podemos contar com a totalidade de regiões e ORFS preditas para esta “espécie” de *Shigella* spp. O outro fator seria o tamanho da seqüência obtida (126 bases) ser relativamente curto, não proporcionando uma quantidade de informação suficiente que permitisse uma comparação e alinhamento fiel entre a seqüência obtida e o banco de dados do GenBank. Porém, é possível concluir que ambas as seqüências obtidas pertencem ao gênero *Shigella* spp., e provavelmente correspondem à mesma região do genoma. Como este fragmento seqüenciado apareceu em todas as quatro “espécies” de *Shigella* spp. testadas, sugere-se a existência de pressão seletiva no sentido de manter esta região intacta.

Como se trata de uma região conservada do genoma, esta região poderia, portanto, ser utilizada no desenho de “primers” para reação de PCR específica para a identificação do gênero *Shigella* spp. No entanto, a análise do BLAST mostrou também que essas seqüências conservadas obtidas em *Shigella* spp. apresentavam similaridade com regiões do genoma de *E. coli*. A seqüência obtida do fragmento da amostra SF43 mostrou 94% de similaridade com a região de nucleotídeos 140072 a 140519 de *E. coli* linhagem CFT 073 (referência AE016759.1 – GenBank) e a seqüência da amostra SS52 mostrou 89% de similaridade com a região 140465 a 140573 de *E. coli* linhagem CFT 073 (referência AE016759.1 – GenBank). Essa região do genoma de *E. coli* também não apresenta nenhuma ORF predita. A análise no ClustalW revelou que essas seqüências se sobrepõem e são flanqueadas por seqüências ERIC.

Os trabalhos de Jin *et al.* (2002) e Goldberg *et al.* (2003) mostraram que *Shigella flexneri* e *E. coli* linhagens K12 e O157:H7 apresentam muitas semelhanças em seus genomas, o que reforçou a hipótese de *Shigella* spp. estar contida no grupo de *E. coli* e não constituir um gênero a parte. O presente trabalho mostrou ainda que provavelmente existe uma região não codificante conservada entre essas duas bactérias, que de alguma forma está sendo mantida evolutivamente por estarem flanqueadas por seqüências ERIC, que estariam sendo mantidas nesta região devido a alguma pressão seletiva. Tal fato atenta para a hipótese destas seqüências ERIC serem importantes de alguma forma para a manutenção da estabilidade do genoma bacteriano. Um estudo mais aprofundado dessa região, provavelmente indicaria alguma função ainda não descrita para as seqüências ERIC. Acredita-se que essas seqüências forneceriam um sinal de ligação conservado para proteínas envolvidas no metabolismo do DNA, por exemplo, como sítio de ancoragem para proteínas regulatórias e estruturais, sendo importantes para a organização e empacotamento do cromossomo bacteriano (Sharples & Lloyd, 1990).

A comparação da seqüência SF43 com o banco de dados do BLAST revelou ainda uma similaridade de 91% com a região dos nucleotídeos 1038 a 954 do clone de *S. boydii* BH147 (referência AY219466.1 – GenBank), que corresponde à seqüência de inserção IS1SB. A seqüência obtida para SS52 também mostrou similaridade de 90% com a região 1092 a 984 do clone de *S. boydii* BH147 (referência AY219466.1 – GenBank), também correspondendo à seqüência de inserção IS1SB. Tal comparação pode também ter sido fruto do reduzido tamanho desta seqüência, fazendo com que o fragmento extraído de *S. sonnei* mostre homologia com a linhagem de *S. boydii*. No entanto, este resultado é bastante satisfatório, pois revela a complexidade existente entre os

quatro grupos de *Shigella* spp., no sentido de não existirem quatro “espécies” distintas, mas sim possíveis subtipos de *E. coli*. Os dados do sequenciamento completo das linhagens padrões de *S. flexneri* (Jin *et al.*, 2002) revelam a presença de 247 seqüências de inserção (IS, “insertion sequences”) completas e 67 parciais espalhadas por todo o genoma bacteriano, sendo IS1 o tipo de IS predominante. Essas seqüências são intimamente relacionadas com a dinâmica do cromossomo bacteriano, sendo responsáveis por diversos rearranjos genéticos, como, por exemplo, inversões, deleções e transposições mediadas por transposons, fazendo com que tais seqüências de inserção sejam importantes para a evolução do genoma de *Shigella* spp. A possível presença de uma IS no fragmento conservado sugere uma outra possível aplicação da utilização desta seqüência como marcador epidemiológico, uma vez que diferentes sorotipos provavelmente possuirão diferenças na constituição de suas seqüências de inserção (Jin *et al.*, 2002).

Além disso, a presença de uma seqüência de inserção (IS) nas proximidades de seqüências ERIC poderia sugerir ainda um possível mecanismo de surgimento, herança e disseminação deste pequeno elemento no genoma bacteriano. Os elementos ERIC são muito pequenos para possuírem algum gene de transposase ou integrase, portanto, acredita-se que essas seqüências sejam resquícios de elementos transponíveis ou fragmentos de DNA que teriam sido disseminados por elementos transponíveis funcionais, como transposons, integrons e outras IS (Sharples & Lloyd, 1990).

6 - CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1 – No período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000 foram isoladas 64 amostras de *Shigella* spp. pela Unidade de Emergência do HC. 82% dos casos eram crianças de até 10 anos de idade. A região de Ribeirão Preto apresenta um quadro endêmico de shigelose, sendo que as “espécies” mais isoladas foram *S. flexneri* e *S. sonnei*.

2 – A análise da sensibilidade a antibióticos revelou a emergência de amostras resistentes a sulfonamida, tetraciclina, ampicilina, e em menor quantidade, cloranfenicol. Não foram encontradas amostras resistentes à cefoxitina e ácido nalidíxico. 35,13% das amostras são multirresistentes (MR), ou seja, resistentes a pelo menos três classes distintas de antibióticos.

3 – Por meio da análise dos dendrogramas da ribotipagem, do ERIC e do REP-PCR, verificou-se que as amostras multirresistentes (MR) de *S. flexneri* encontravam-se formando um grupo com elevada similaridade genética, sugerindo a hipótese de origem clonal para essas amostras MR.

4 – A tipagem molecular por ribotipagem, ERIC e REP-PCR revelaram o polimorfismo genético existente na população bacteriana estudada. Entretanto, REP e ERIC-PCR se mostraram mais eficientes em discriminar as amostras analisadas por gerar um maior padrão de bandas.

5 – As técnicas de ribotipagem, REP e ERIC-PCR mostraram também que dentro do grupo *Shigella* spp., *S. sonnei* e *S. flexneri* estão mais relacionadas entre si, apresentando um maior grau de similaridade, do que estas em relação a *S. dysenteriae* e *S. boydii*.

6 – Por meio do ERIC-PCR foi possível verificar a presença de uma região conservada do genoma de *Shigella* spp. presente nas quatro “espécies”, que não codifica nenhum gene específico e poderia ser utilizada para diagnóstico do gênero através de reação de PCR.

7 – Esta região conservada também apresentou similaridade com *E. coli*. Sugeriu-se que de alguma forma ela estaria sendo mantida evolutivamente por estarem flanqueadas por seqüências ERIC, que são conservadas nesta região devido a alguma pressão seletiva, indicando que estas seqüências ERIC poderiam ser importantes para a manutenção da estabilidade do genoma bacteriano.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, M. T. G.; DA SILVA, R. M.; DONAIRE, L. M.; MOREIRA, L. E.; MARTINEZ, M. B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **Jornal de Pediatria**. v. 74, p. 291-298, 1998.

ALLAOUI, A.; MOUNIER, J.; PRÉVOST, M.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. **Mol. Microbiol.** v. 6, p. 1605-1616, 1992.

ANDREWS, G. P.; MAURELLI, A. T. *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homologue of the low-calcium response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. **Infect. Immun.** v. 60, p. 3287-3295, 1992.

ASHKENAZI, S.; LEVY, I.; KAZARONOVSKI, V.; SAMRA, Z. Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 51, p. 427-429, 2003.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; K. STRUHL. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.

BACOT, C. M.; REEVES, R. H. Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 4234-4236, 1991.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. DNA Amplification Fingerprinting of Bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 38, p. 70-76, 1992.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493-496, 1966.

BLASER, M. J.; POLLARD, R. A.; FELDMAN, R. A. *Shigella* infections in the United States 1974-1980. **J. Infect. Dis.** v. 147, p. 771-775, 1983.

BENNISH, M. L.; HARRIS, J. R.; WOJTYNIAK, B. J.; STRUELENS, M. Death in Shigellosis: Incidence and Risk Factors in Hospitalized Patients. **J. Infect. Dis.** v. 161, p. 500-506, 1990.

BIER, OTTO. **Microbiologia e Imunologia**. 30ª edição. São Paulo: Melhoramentos, 1990.

**Modelos de Referências para dissertações e teses organizados de acordo com normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT) – NBR 6023.

BINGEN, E. H.; DENAMUR, E.; ELION, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 7, p. 311-327, 1994.

BOCCARD, F.; PRENTKI, P. Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. **EMBO J.** v. 12, p. 5019-5027, 1993.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; SKERMAN, F. J.; FALKO, W. S. Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. **J. Bacteriol.** v. 109, p. 953-965, 1972.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; MIKLOS, G. V.; STEIGERWALT, A. G. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 23, p. 1-7, 1973.

BRENNER, D. J.; STEIGERWALT, A. G.; GAIL WATHEN, H.; GROSS, R. J.; ROWE, B. Confirmation of aerogenic strains of *Shigella boydii* 13 and further study of *Shigella* serotypes by DNA relatedness. **J. Clin. Microbiol.** v. 16, p. 432-436, 1982.

BROCCHI, M.; SPERANDIO, V.; SILVEIRA, W. D. Mecanismos Moleculares de Patogenicidade em *Shigella*. In: **Série Monografias N° 8**. Ribeirão Preto: Ed. SBG, 1998. p. 41-61.

CHIOU, C-S.; HSU, W-B.; WEI, H-L.; CHEN, J-H. Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p. 1048-1056, 2001.

COVONE, M. G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; DIAS DA SILVEIRA, W.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, C. L. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat labile enterotoxin. **Infect. Immun.** v. 66, p. 224-231, 1998.

CROMIE, G.; COLLINS, J.; LEACH, D. Sequence interruptions in enterobacterial repeated elements retain their ability to encode well-folded RNA secondary structures. **Mol. Microbiol.** v. 24, p. 1311-1315, 1997.

DICE, L. R. Measures of the Amount of Ecologic Associations between Species. **Journal of Ecology.** v. 26, 1945.

DIMRI, G. P.; RUDD, K. E.; MORGAN, M. K.; BAYAT, H.; AMES, G. F. L. Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and other enteric bacteria. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 4583-4593, 1992.

DODD, C. E. R.; JONES, D. A Numerical Taxonomic Study of the Genus *Shigella*. **J. Gen. Microbiol.** v. 128, p. 1933-1957, 1982.

DONNENBERG, M. S.; Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**. v. 406, p. 768-774, 2000.

DORMAN, C. J. DNA topology and global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. **Microbiol.** v. 141, p. 1271-1280, 1995.

DUPONT, H. L.; LEVINE, M. M.; HORNICK, R. B.; FORMAL, S. B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. **J. Infect. Dis.** v. 159, p. 1126-1128, 1989.

EBERHARDT, K. R.; FLIGNER, M. A. A comparasion of two tests for equality of proportions. **Amer. Statist.**, v. 31, p. 151-155, 1977.

FARMER, J. J. L.; KELLY, M. T. Manual of Clinical Microbiology, In: BALOWS, A.; HAUSLER, W. J. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. **American Society for Microbiology**. Washington, 1991. p. 360-383.

FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; RAHMAN, M. M.; ALIM, A. R. M. A.; AHMAD, Q. S.; ALBERT, M. J.; SACK, R. B. Differentiation of *Shigella flexneri* strains br rRNA gene restriction patterns. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 2996-2999, 1992.

GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. **Mol. Microbiol.** v. 20, p. 263-271, 1996.

GALLEGO, F. J.; MARTÍNEZ, I. Method to Improve Reliability of Random-Amplified Polymorphic DNA Markers. **BioTechniques**. v. 23, p. 663-664, 1997.

GILSON, E.; PERRIN, D.; SAURIN, W.; HOFNUNG, M. Species specificity of bacterial palindromic units. **J. Mol. Evol.** v. 25, p. 371-373, 1987.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to E. coli palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic. Acids Res.** v. 18, p. 3941-3952, 1990.

GILSON, E.; BACHELLIER, S.; PERRIN, S.; PERRIN, D.; GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; HOFNUNG, M. Palindromic unit highly repetitive DNA sequences exhibit species specificity within *enterobacteriaceae*. **Res. Microbiol.** v. 141, p. 1103-1116, 1990.

GILSON, E.; SAURIN, W.; PERRIN, D.; BACHELLIER, S.; HOFNUNG, M. Palindromic units are part of a new bacterial interspersed mosaic element (BIME). **Nucleic Acids Research**. v. 19, p. 1375-1383, 1991.

GOMES, T. A. T.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.** v. 164, p. 331-337, 1991.

GOULLET, P. H.; PICARD, B. Differentiation of *Shigella* by esterase eletrophoretic polymorphism. **J. Gen. Microbiol.** v. 133, p. 1005-1017, 1987.

GOLDBERG, M. B.; SANSONETTI, P. J. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. **Infectm Immun.** v. 61, p. 4941-4946, 1993.

GREENWOOD, D. Resistance to antimicrobial agents: a personal view. **J. Med. Microbiol.** v. 47, p. 751-755, 1998.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** v. 137B, p. 165-175, 1986.

HALE, T. L. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. **Microbiol. Rev.** v. 55, p. 206-222, 1991.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol. Nov.** v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HIGH, N.; MOUNIER, J.; PRÉVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **EMBO J.** v. 11, p. 1991-1999, 1992.

HINOJOSA-AHUMADA, M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S. B.; CAMERON, D. N.; KIEHLBAUCH, J. A.; WACHSMUTH, I. K.; STROCKBINE, N. A. Restriction fragment length polymorphisms in rRNA operons for subtyping *Shigella sonnei*. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 2380-2384, 1991.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.** v. 26, p. 2465-2466, 1988.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBER, E. A. **Microbiologia Médica.** 21ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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

JIN, Q.; YUAN, Z.; XU, J.; WANG, Y.; SHEN, Y.; LU, W.; WANG, J.; LIU, H.; YANG, J.; YANG, F.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; YANG, G.; WU, H.; QU, D.; DONG, J.; SUN, L.; XUE, Y.; ZHAO, A.; GAO, Y.; ZHU, J.; KAN, B.; DING, K.; CHEN, S.; CHENG, H.; YAO, Z.; HE, B.; CHEN, R.; MA, D.; QIANG, B.; WEN, Y.; HOU, Y.; YU, J. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. **Nucleic. Acids. Res.** v. 30, p. 4432-4441, 2002.

JOHNSON, J. R. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? **J. Med. Microbiol.** v. 49, p. 583-585, 2000.

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Improved Repetitive-Element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 7, p. 258-264, 2000.

JOHNSON, J. R.; O'BRYAN, T. T. Improved Repetitive-Element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 7, p. 265-273, 2000.

KHAN, M. U. Interruption of shigellosis by hand washing. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.** v. 76, p. 164-168, 1982.

KOTLOFF, K. L.; WINICKOFF, J. P.; IVANOFF, B.; CLEMENS, J. D.; SWERDLOW, D. L.; SANSONETTI, P. J.; ADAK, G. K.; LEVINE, M. M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. W. H. O.** v. 77, p. 651-666, 1999.

LAN, R.; REEVES, P. R. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. **Microbes and Infection.** v. 4, p. 1125-1132, 2002.

LEE, T-M.; CHANG, C-Y.; CHANG, L-L.; CHEN, W-M.; WANG, T-K.; CHANG, S-F. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 45, p. 173-181, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, A. A. M.; LIMA, N. L.; PINHO, M. C. N.; BARROS, JR. E. A.; TEIXEIRA, M. J.; MARTINS, M. C. V.; GUERRANT, R. L. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with Shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 39, p. 256-259, 1995.

LIMA, A. A. M.; SIDRIM, J. J. C.; LIMA, N. L.; TITLOW, W.; EVANS, M. E.; GREENBERG, R. N. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, p. 1061-1065, 1997.

LIU P.Y.; LAU, Y.J.; HU, B.S.; SHYR, J.M.; SHI, Z.Y.; TSAI, W.S.; LIN, Y.H.; TSENG, C.Y. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. **J. Clin. Microbiol.** v. 33(7), p. 1779-83, 1995.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15, p. 647-679, 2002.

- MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.
- MAURELLI, A. T.; BAUDRY, B.; D'HAUTEVILLE, H.; HALE, T. L.; SANSONETTI, P. J. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.** v. 49, p. 164-171, 1985.
- MEDEIROS, M. I. C.; NEME, S. N.; SILVA, P.; CAPUANO, D. M.; ERRERA, M. C.; FERNANDES, S. A.; VALLE, G. R.; AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 43(1), p. 21-24, 2001.
- MÉNARD, R.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. Nonpolar mutagenesis on the *ipa* genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 5899-5906, 1993.
- MÉNARD, R.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri*: Isolation of noninvasive mutants of Gram-negative pathogens. **Methods. Enzymol.** v. 236, p. 293-259, 1994.
- MÉNARD, R.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is induced by the epithelial cell and controlled by IpaD. **EMBO J.** v. 13, p. 5293-5302, 1996.
- MENDOZA, M. C.; MARTIN, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A. Usefulness of ribotyping in a molecular epidemiology study of shigellosis. **Epidemiol. Infect.** v. 116, p. 127-135, 1996.
- MOUNIER, J.; VASSELON, T.; HELLIO, R.; LESOURD, M.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* enters Human Colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. **Infect. Immun.** v. 60, p. 237-248, 1992.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PLALLER, M. A. **Medical Microbiology**. 3rd Edition. St Louis: Mosby-year Book, 1998.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th Edition. Washington-DC: ASM Press, 2003.
- NASTASI, A.; PIGNATO, S.; MAMMINA, C.; GIAMMANCO, G. rRNA gene restriction patterns and biotypes of *Shigella sonnei*. **Epidemiol. Infect.** v. 110, p. 23-30, 1993.
- NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 8th edition. M2-A8. Wayne- PA: Approved Standard, NCCLS, 2003.
- NEWBURY, S. F.; SMITH, N. H.; HIGGINS, C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. **Cell.** v. 51, p. 1131-1143, 1987.

NEWBURY, S. F.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HILES, I. D.; HIGGINS, C. F. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**. v. 48, p. 297-310, 1987a.

ORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**. v. 252, p. 91-106, 2002.

OCHMAN, H.; WHITTAM, T. S.; CAUGANT, D. A.; SELANDER, R. K. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. **J. Gen. Microbiol.** v. 129, p. 2715-2726, 1983.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OPLUSTIL, C. P.; NUNES, R.; MENDES, C.; RESISTNET Group. Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET surveillance program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 5, p. 8-12, 2001.

PHILPOTT, D. J.; EDGEWORTH, J. D.; SANSONETTI, P. J. The Pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** v. 355, p. 575-586, 2000.

PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** v. 67, p. 546-553, 1999.

PRESTON, M. A.; BORCZYK, A. A. Genetic variability and molecular typing of *Shigella sonnei* strains isolated in Canada. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p. 1427-1430, 1994.

PUPO, G. M.; KARAOLIS, D. K. R.; LAN, R.; REEVES, P. R. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus anzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. **Infect. Immun.** v. 65, p. 2685-2692, 1997.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 97, p. 10567-10572, 2000.

ROLLAND, K.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; PICARD, B.; DENAMUR, E. *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains from *E. coli*. **Microbiology**. v. 144, p. 2667-2672, 1998.

RUDNER, R.; STUDAMIRE, B.; JARVIS, E. D. Determinations of restriction fragment length polymorphism in bacteria using ribosomal RNA genes. **Methods. Enzymol.** v. 235, p. 184-96, 1994.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. *Shigella* infection. In: **Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach**. Washington: ASM Press, 1994. p. 229-243.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a edição. Cold Spring Harbor-NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. *Shigella sonnei* Plasmids: Evidence that a Large Plasmid is Necessary for Virulence. **Infect. Immun.** v. 34, p. 75-83, 1981.

SANSONETTI, P. J.; MOURNIER, J.; PRÉVOST, M. C.; MERÈGE, R. M. Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. **Cell.** v. 76, p. 829-839, 1994.

SANSONETTI, P. J.; ARONDEL, J.; CANTEY, J. R.; PRÉVOST, M. C.; HUERRE, M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infect. Immun.** v. 64, p. 2752-2764, 1996.

SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. M. Cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. **Semin. Immunol.** v. 11, p. 193-203, 1999.

SASAKAWA, C.; KAMATA, K.; SAKAI, T.; MAKINO, S.; YAMADA, M.; OKADA, N.; YOSHIKAWA, M. Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. **J. Bacteriol.** v. 170, p. 2480-2484, 1988.

SASAKAWA, C.; ADLER, B.; TOBE, T.; OKADA, N.; NAGAI, S.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M. Functional organization and nucleotide sequence of virulence region-2 on the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* 2a. **Mol. Microbiol.** v. 3, p. 1191-1201, 1989.

SCHMID, C. W.; JELINEK, W. R. The *Alu* family of dispersed repetitive sequences. **Science.** v. 216, p. 1065-1070, 1982.

SEARS, C. L.; KAPPER, J. B. Enteric bacterial toxins: Mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** v. 60, p. 167-215, 1996.

SELANDER, R. K.; LEVIN, B. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science.** v. 210, p. 545-547, 1980.

SHARP, P. M. Insertions within ERIC sequences. **Mol. Microbiol.** v. 24, p. 1314-1315, 1997.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research.** v. 18, p. 6503-6508, 1990.

SHEARS, P. A review of bacterial resistance to antimicrobial agents in tropical countries. **Annals of Tropical Paediatrics.** v. 13, p. 219-226, 1993.

SHEARS, P. Shigella Infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 90, p. 105-144, 1996.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature.** v. 163, p. 688, 1949.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. **J. Bacteriol.** v. 176, p. 1729-1737, 1994.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature.** v. 193, p. 855-860, 1962.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** v. 98, p. 503-517, 1975.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell.** v. 37, p. 1015-1026, 1984.

STROCKBINE, N. A.; PARSONNET, K. G.; KIEHLBAUCH, J. A.; WACHSMUTH, I. K. Molecular epidemiologic techniques in analyses of epidemic and endemic *Shigella dysenteriae* type 1 strains. **J. Infect. Dis.** v. 163, p. 406-409, 1991.

SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. **Infect. Immun.** v. 69, p. 5959-5966, 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HÉBERT, G. A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIS, W. R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; MCDUGAL, L. K.; MILLER, J. M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M. A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p. 407-415, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TSANG, A. Y.; DENNER, J. C.; BRENNEN, P. J.; MCCLATCHEY, J. K. Clinical and epidemiological importance of typing *Mycobacterium avium* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 479-484, 1992.

vanBELKUN, A.; STRUELENS, M.; deVISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 14, p. 547-560, 2001.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucl. Acid. Res.** v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WASSEF, J. S.; KEREN, D. F.; MAILLOUX, J. L. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. **Infect. Immun.** v. 57, p. 858–863, 1989.

WEI, J.; GOLDBERG, M. B.; BURLAND, V.; VENKATESAN, M. M.; DENG, W.; FOURNIER, G.; MAYHEW, G.; PLUNKETT III, G.; ROSE, D.; DARLING, A.; MAU, B.; PERNA, N.T.; PAYNE, S. M.; RUNYEN-JANECKY, L.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; BLATTNER, F. R. Complete genomic sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2775–2786, 2003.

WEN-HSIUNG, L. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 78, p. 1085-1089, 1981.

WOODS, C. R.; VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 1927-1931, 1993.

WU, F.; DELLA-LATTA, P. Molecular typing strategies. **Seminars in Perinatology.** v. 26, p. 357-366, 2002.

YANG, Y.; AMES, G. F. L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 85, p. 8850-8854, 1988.

ZARKO-POSTAWAKA, M.; MORDARSKI, M.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. Organization and nucleotide sequence analysis of the ribosomal gene set (rmB) from *Streptomyces lividans*. **Gene.** v. 185, p. 231-237, 1997.

ZYCHLINSKY, A.; PRÉVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature.** v. 358, p. 167-169, 1992.

ZYCHLINSKY, A.; FITTING, C.; CAVAILLON, J. M.; SANSONETTI, P. J. Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. **J. Clin. Investig.** v. 94, p. 1328–1332, 1994.