UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de
resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no
Estado de São Paulo**

Amanda Aparecida Seribelli

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de
resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no
Estado de São Paulo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Amanda Aparecida Seribelli

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Seribelli, Amanda Aparecida

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no Estado de São Paulo. Ribeirão Preto, 2016.

95p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Falcão, Juliana Pfrimer

1. *Shigella sonnei* 2. PFGE 3. MLVA 4. ERIC-PCR 5. MLST 6. Genes de virulência 7. Perfil de resistência a antimicrobianos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda Aparecida Seribelli

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no Estado de São Paulo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Dedico este trabalho aos meus amados e
queridos pais e irmãos que são muito
importantes na minha vida!”*

Agradecimentos

Á Deus e à Santa Clara de Assis por me iluminarem e me guiarem durante toda a minha trajetória;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos diários e pelo carinho durante todo esse tempo;

Aos amigos do laboratório, Carolina, Fábio, Júlia, Miliane e Roberto, pela disposição em ajudar, por me receberem de braços abertos, pelas sugestões e discussões científicas realizadas e pelos momentos de descontração. Adoro fazer parte desse grupo!

Aos meus pais Donizeti e Cássia, aos meus irmãos Lucas e Aline por me apoiarem, pelo amor incondicional e por me escutarem sempre que eu precisei. Amo muito vocês!

Ao meu cunhado José pela ajuda com a formatação do presente trabalho.

À Vania Claudia de Albuquerque pelo auxílio administrativo, pela ajuda com o resumo em espanhol e pela amizade;

À Jaqueline Passaglia e Eliane Figueiredo pelo apoio técnico no decorrer deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pelo uso do sequenciador no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática - Sala de Sequenciamento do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto;

À Adriana Aparecida Marques, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela eletroforese capilar e pelo sequenciamento realizado;

Aos funcionários da FCFRP-USP, especialmente aos funcionários da pós-graduação Henrique Theodoro e Rosana Florêncio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio pesquisa;

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não importa o que você seja, quem você seja
ou o que deseja na vida, a ousadia em ser
diferente reflete na sua personalidade, no seu
caráter, naquilo que você é!”*

Ayrton Senna

RESUMO

Seribelli, A. A. **Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no Estado de São Paulo.** 2016. 95f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Shigella spp. está entre as quatro bactérias mais isoladas de fezes diarreicas no Brasil. No mundo cerca de 164,7 milhões de casos de shigelose ocorrem anualmente, sendo a maioria em países em desenvolvimento. O gênero *Shigella* spp. possui quatro espécies, sendo *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* as espécies mais frequentemente isoladas no Brasil e no mundo. O monitoramento de linhagens resistentes de *Shigella* spp. é essencial, pois este garante uma terapia eficiente quando necessária. Especificamente, a maioria dos estudos realizados com linhagens de *S. sonnei* no país verificaram apenas a ocorrência dessa e há poucos estudos que investigaram o potencial patogênico e a diversidade genotípica dessa espécie. Os objetivos desse projeto foram analisar o potencial patogênico, o perfil de resistência a antimicrobianos e a diversidade genotípica de linhagens de *S. sonnei* isoladas durante três décadas no Estado de São Paulo. No total foram caracterizadas 72 linhagens de *S. sonnei* isoladas de humanos, entre os anos de 1983 a 2014, quanto à presença de 12 genes de virulência por PCR, perfil de suscetibilidade frente a 16 antimicrobianos por disco difusão e tipagem molecular por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) e 20 linhagens tipadas por *Multi-locus sequence typing* (MLST). Todas as linhagens apresentaram os genes de virulência *ipaH*, *iuc* e *sigA*. O gene *ipaBCD* foi encontrado em 14 (19%) linhagens, os genes *ial* e *virF* em 13 (18%) linhagens e o gene *sen* em sete (10%) linhagens. Os genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sat* e *sepA* não foram detectados. As mais altas taxas de resistência foram frente à sulfametoxazol-trimetoprim encontrada em 42 (58,3%) linhagens e frente à tetraciclina encontrada em 30 (41,6%) linhagens. Onze (15,5%) linhagens foram resistentes à ampicilina e piperacilina. Três (4,2%) linhagens foram resistentes à cefotaxima. Três (4,2%) linhagens foram resistentes ao cloranfenicol. Duas (2,8%) linhagens foram resistentes à ampicilina-sulbactam. Duas (2,8%) linhagens foram resistentes ao ácido nalidíxico. Uma (1,4%) linhagem foi resistente à amoxicilina-ácido clavulânico. Cinco (7%) linhagens foram multidroga resistentes (MDR). O dendrograma gerado pelo PFGE agrupou as 72 linhagens de *S. sonnei* em dois *clusters* designados PFGE-A e PFGE-B. O *cluster* PFGE-A agrupou 39 linhagens isoladas entre 1983-2014 com uma similaridade $\geq 73,6\%$ e mais especificamente 35 dessas linhagens apresentaram uma similaridade $\geq 80,3\%$. O

cluster PFGE-B agrupou 33 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre 1984-2014 com uma similaridade $\geq 74,7\%$ e 27 dessas linhagens exibiram uma similaridade $\geq 83,0\%$. Similarmente, o dendrograma gerado pelo ERIC-PCR agrupou as 72 linhagens de *S. sonnei* em dois *clusters* designados ERIC-A e ERIC-B. O *cluster* ERIC-A agrupou 37 linhagens isoladas entre 1983-2014 que exibiram uma similaridade $\geq 78,8\%$ e mais especificamente 36 dessas linhagens apresentaram uma similaridade $\geq 82,3\%$. O *cluster* ERIC-B agrupou 34 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre 1987-2014 que exibiram uma similaridade $\geq 84,0\%$. Também por MLVA as linhagens foram agrupadas em dois *clusters* designados MLVA-A e MLVA-B. O *cluster* MLVA-A agrupou 31 linhagens isoladas entre 1983-2014 com uma similaridade $\geq 40\%$. O *cluster* MLVA-B agrupou 41 linhagens isoladas entre 1983-2014 com uma similaridade $\geq 21,6\%$. Todas as 20 *S. sonnei* foram tipadas por MLST como ST152. Conclui-se que o potencial patogênico das linhagens estudadas foi destacado pela presença de importantes genes de virulência. A alta porcentagem de resistência para alguns antimicrobianos testados, tais como, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina é preocupante e pode levar à falha terapêutica. Os resultados da tipagem molecular sugerem que existam dois subtipos prevalentes nas linhagens de *S. sonnei* estudadas que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo. O resultado do MLST indica que as linhagens estudadas de *Shigella sonnei* isoladas no Brasil descendem de um precursor comum.

Palavras-chave: *Shigella sonnei*, genes de virulência, perfil de resistência a antimicrobianos, PFGE, MLVA, ERIC-PCR, MLST

ABSTRACT

Seribelli, A. A. **Analysis of the potential pathogenic, genotypic diversity and resistance profile of *Shigella sonnei* strains isolated from 1983 to 2014 in the State of São Paulo.** 2016. 95f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Shigella spp. is among the four most isolated bacteria from diarrheal faeces in Brazil. In the world about 164.7 million cases of shigellosis occur annually, mostly in developing countries. The genus *Shigella* spp. comprises four species, being *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* the most frequently isolated species in Brazil and worldwide. The monitoring of resistant strains of *Shigella* spp. is essential and ensures an effective therapy when necessary. Specifically, the majority of the studies with *S. sonnei* performed in the country verified only the occurrence of this bacterium and there are few studies that investigated the pathogenic potential and genotypic diversity of this species. The aims of this project were to analyze the pathogenic potential, antimicrobial resistance profile and genotypic diversity of *S. sonnei* strains isolated during three decades in the State of São Paulo. In total, 72 of *S. sonnei* strains isolated from humans, between the years 1983-2014, were characterized for the presence of 12 virulence genes by PCR, resistance profile against 16 antimicrobials by disk diffusion and molecular typing by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR), Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) and 20 strains typed by Multi-locus sequence typing (MLST). All the strains contained the *ipaH*, *iuc* and *sigA* genes. The *ipaBCD* gene was detected in 14 (19%) strains, the *ial* and *virF* genes in 13 (18%) strains and the *sen* gene in seven (10%) strains. The *set1A*, *set1B*, *pic*, *sepA* and *sat* genes were not detected. The highest resistance rates were against trimethoprim-sulfamethoxazole found in 42 (58.3%) strains and against tetracycline found in 30 (41.6%) strains. Eleven (15.5%) strains were resistant to ampicillin and piperacillin. Three (4.2%) strains were resistant to cefotaxime. Three (4.2%) strains were resistant to chloramphenicol. Two (2.8%) strains were resistant to ampicillin-sulbactam. Two (2.8%) strains were resistant to nalidixic acid. One (1.4%) strain was resistant to amoxicillin-clavulanic acid. Five (7%) strains were multidrug resistant (MDR). The dendrogram generated by PFGE grouped the 72 *S. sonnei* strains into two clusters designated PFGE-A and PFGE-B. The PFGE-A cluster comprised, 39 *S. sonnei* strains isolated between 1983 and 2014 with a similarity above 73.6% and more specifically 35 of those strains exhibited a similarity $\geq 80.3\%$. The PFGE-B cluster grouped, 33 *S. sonnei* strains isolated between 1984 and 2014 with a similarity above 74.7%, and 27 of those strains exhibited a similarity above 83.0.

Similarly, the dendrogram generated by ERIC-PCR grouped the 72 *S. sonnei* strains into two clusters designated ERIC-A and ERIC-B. The ERIC-A cluster comprised, 37 *S. sonnei* strains isolated between 1983 and 2014 that exhibited a similarity above 78.8% and specifically 36 strains of those exhibited a similarity $\geq 82.3\%$. The ERIC-B cluster grouped, 34 *S. sonnei* strains isolated between 1987 and 2014 that exhibited a similarity above 84.0%. Also, by MLVA strains were grouped into two clusters designated MLVA-A and MLVA-B. The MLVA-A cluster comprised 31 strains isolated between 1983 and 2014 with a similarity $\geq 40\%$. The MLVA-B cluster comprised 41 strains isolated between 1983 and 2014 with a similarity $\geq 21.6\%$. All the 20 *S. sonnei* were typed by MLST as ST152. In conclusion, the possible pathogenic potential of the strains studied was highlighted by the presence of important virulence genes. The high percentage of resistance to some of the antimicrobials tested such as trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline is worrying and may lead to therapeutic failure. Molecular typing results may suggest that there are two prevalent subtypes of *S. sonnei* strains studied that differed little genetically and have been contaminating humans over 31 years in the metropolitan region of Ribeirão Preto in the São Paulo State in Brazil. The result of MLST indicates that the *Shigella sonnei* strains studied isolated in Brazil descended from a common precursor.

Palavras-chave: *Shigella sonnei*, virulence genes, antimicrobials resistance profile, PFGE, MLVA, ERIC-PCR, MLST

RESUMEN

Seribelli, A. A. **Análisis del potencial patogénico, la diversidad genotípica y perfil de resistencia de cepas de *Shigella sonnei* aisladas de 1983 a 2014 en el Estado de São Paulo.** 2016. 95f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Shigella spp. está entre las cuatro de las bacterias de heces diarreicas más aisladas en Brasil. En el mundo cerca de 164,7 millones de casos de shigelosis ocurren anualmente, siendo la mayoría en países en desarrollo. El género *Shigella* spp. posee cuatro especies donde *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* son las especies más frecuentemente aisladas en Brasil y en el mundo. La monitorización de cepas resistentes de *Shigella* spp. Es fundamental pues este garantizar una terapia eficiente cuando necesario. Específicamente, la mayoría de los estudios realizados con cepas de *S. sonnei* en el país apenas verificaron su ocurrencia y hay pocos estudios que investigan el potencial patogénico y la diversidad genotípica de esa especie. Los objetivos de ese estudio fueron analizar el potencial patogénico, el perfil de resistencia a antimicrobianos y la diversidad genotípica de cepas de *S. sonnei* aisladas durante tres décadas en el Estado de São Paulo. En su total fueron caracterizadas 72 cepas de *S. sonnei* aisladas de humanos, entre los años de 1983 a 2014, cuanto la presencia de 12 genes de virulencia por PCR, perfil de susceptibilidades frente a 16 antimicrobianos por difusión en disco y tipificación molecular por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) y tipificación de 20 cepas por *Multi-locus sequence typing* (MLST). Todas las cepas presentaron los genes de virulencia *ipaH*, *iuc* y *sigA*. El gene *ipaBCD* fue encontrado en 14 (19%) cepas, los genes *ial* y *virF* en 13 (18%) cepas y el gene *sen* en 7 (10%) cepas. Los genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sat* y *sepA* no fueron detectados en ninguna de las cepas estudiadas. Entre las cepas estudiadas 42 (58,3%) fueron resistentes al sulfametoxazol-trimetoprim, 30 (41,6%) cepas fueron resistentes a tetraciclina, 11 (15,5%) cepas fueron resistentes a ampicilina y piperacilina, 3 (4,2%) cepas fueron resistentes a cefotaxima, 3 (4,2%) cepas fueron resistentes al cloranfenicol, 2 (2,8%) cepas fueron resistentes a la ampicilina-sulbactam, 2 (2,8%) cepas fueron resistentes al ácido nalidíxico y 1 (1,4%) cepa fue resistente a la amoxicilina-ácido clavulánico. De esas cepas, 5 (7%) presentaron resistencia multi droga (MDR). Las 72 cepas de *S. sonnei* fueron agrupadas por PFGE en PFGE-A y PFGE-B. En el grupo PFGE-A fueron agrupadas 39 cepas aisladas entre los años 1983-2014 con una similitud $\geq 73,6\%$ entre ellas, siendo que 35 presentaron una similitud $\geq 80,3\%$. En el grupo PFGE-B fueron agrupadas 33 cepas aisladas entre 1984-2014 con una similitud $\geq 74,7\%$.

entre ellas, siendo que 27 presentaron una similitud $\geq 83,0\%$. Similarmente, por ERIC-PCR las cepas fueron agrupadas en dos grupos denominados ERIC-A y ERIC-B. En el grupo ERIC-A fueron agrupadas 37 cepas aisladas entre 1983-2014 con una similitud $\geq 78,8\%$ entre ellas, siendo que 36 mostraron una similitud $\geq 82,3\%$. En el grupo ERIC-B fueron agrupadas 34 cepas aisladas entre 1987-2014 con una similitud $\geq 84,0\%$ entre ellas. Igualmente, por MLVA las cepas fueron agrupadas en dos grupos denominados MLVA-A y MLVA-B. En el grupo MLVA-A fueron agrupadas 31 cepas aisladas entre los años de 1983 a 2014 con una similitud $\geq 40\%$ entre ellas. En el grupo MLVA-B fueron agrupadas cepas aisladas entre los años de 1983 a 2014 con una similitud $\geq 21,6\%$ entre ellas. Todas las 20 cepas de *S. sonnei* fueron tipificadas por MLST como ST152. Por lo tanto, se concluyó que el potencial patogénico de las cepas estudiadas fue destacado por la presencia de importantes genes de virulencia. El alto porcentaje de resistencia a algunos de los antimicrobianos probados es preocupante y puede llevar a una falla terapéutica. Los resultados del PFGE, ERIC-PCR y del MLVA sugieren que existan dos subtipos prevalentes en las cepas de *S. sonnei* estudiadas que poco se diferenciaron genéticamente y contaminaron humanos durante 31 años en la región metropolitana de Ribeirão Preto en el Estado de São Paulo. El resultado del MLST indica que las cepas estudiadas de *Shigella sonnei* aisladas en Brasil descienden de un precursor común.

Palabras-clave: *Shigella sonnei*, genes de virulencia, perfil de resistencia a antimicrobianos, PFGE, MLVA, ERIC-PCR, MLST

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% de algumas linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas.....	40
Figura 2 -	Gel representativo de agarose 1,0% do ensaio de PFGE de algumas linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas após digestão com a enzima <i>XbaI</i>	43
Figura 3 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE com a enzima <i>XbaI</i> para as 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas.....	44
Figura 4 -	Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5% para algumas linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas.....	45
Figura 5 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de ERIC-PCR para as 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas	46
Figura 6 -	Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas.....	48
Figura 7 -	Alinhamento e análise de sequências do gene <i>adk</i> de <i>Shigella sonnei</i> pelo programa <i>ChromasPro</i>	52
Figura 8 -	Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa <i>eBURSTv3</i> com os dados de todas as 8166 linhagens de <i>E. coli</i> e <i>Shigella</i> spp. disponíveis no banco de dados até 19/09/2016.....	53
Figura 9 -	Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa <i>eBURSTv3</i> com as 20 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> selecionadas desse estudo	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos principais genes de virulência de <i>Shigella</i> spp.....	10
Tabela 2 -	Características das 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas isoladas de fezes diarreicas de humanos com shigelose de 1983 a 2014.....	23
Tabela 3 -	Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência por PCR.....	27
Tabela 4 -	<i>Primers</i> utilizados na PCR para a amplificação dos genes relacionados à virulência nas 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas, tamanho dos produtos de amplificação e temperaturas de hibridação	28
Tabela 5 -	Descrição dos reagentes utilizados na reação de ERIC-PCR.....	32
Tabela 6 -	Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos <i>loci</i> SS1, SS10 e SS11..	33
Tabela 7 -	Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos <i>loci</i> SS3, SS6, SS9 e SS23.....	34
Tabela 8 -	Descrição dos reagentes utilizados na PCR do <i>loci</i> SS13.....	34
Tabela 9 -	<i>Primers</i> utilizados para a metodologia de MLVA na tipagem de <i>Shigella sonnei</i>	35
Tabela 10 -	<i>Primers</i> utilizados para a metodologia de MLST na tipagem de <i>Shigella sonnei</i>	36
Tabela 11 -	Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR.....	37
Tabela 12 -	Frequência dos genes de virulência pesquisados para as 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i>	41
Tabela 13 -	Perfil de resistência frente aos 16 antimicrobianos testados nas linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas.....	42
Tabela 14 -	Perfil de resistência das 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas	42
Tabela 15 -	Frequência dos genes de virulência pesquisados nas 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas e o número de linhagens positivas nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B....	50

Tabela 16 -	Perfil de resistência das 72 linhagens de <i>Shigella sonnei</i> estudadas e o número de linhagens resistentes nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B.....	51
--------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Cloranfenicol
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	Caso esporádico
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
D	Índice de discriminação
DLV	<i>Double locus variant</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPM	Escola Paulista de Medicina
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
ESBLs	Beta lactamases de espectro estendido
F	<i>Forward</i>
ial	Locus associado-invasão
IAL-RP	Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto
IDH	Índice de desenvolvimento humano
Ipas	<i>Invasion Plasmid Antigens</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multidroga resistente
MILi	Motilidade-indol-lisina

MS	Ministério da Saúde
MLST	<i>Multi-locus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis</i>
NA	Não aplicável
NA	Ácido nalidíxico
NS	Não significativo
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
POP	Procedimento operacional padrão
PRL	Piperacilina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	<i>Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto
S.	<i>Shigella</i>
S	Surto
SAM	Ampicilina-sulbactam
SCZ	Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLV	<i>Single locus variant</i>
spp.	Espécies
SPATEs	Toxinas autotransportadoras serina protease
STEC	<i>E. coli</i> não O-157
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
TE	Tetraciclina
Tris	Hidroximetilaminometano
TSA	<i>Tryptone Soya Agar</i>

TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UPEC	<i>E. coli uropatogênica</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
™	<i>Trademark</i>
°C	Graus Celsius
Σ	Somatório
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
-	Negativo
+	Positivo
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
Kb	Quilobase (s)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton (s)
MDa	Megadalton (s)
mg	Miligrama (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
pmol	Picomol
T	Timina
U	Unidade (s)
V	Volt (s)
X	Vez (es)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Gênero <i>Shigella</i>	2
1.2. <i>Shigella sonnei</i>	4
1.3. Transmissão, manifestações clínicas e patogênese	5
1.4. Genes de virulência	6
1.5. Resistência a antimicrobianos	11
1.6. Métodos de tipagem molecular	11
1.6.1. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	12
1.6.2. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> PCR (ERIC-PCR)	13
1.6.3. <i>Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis</i> (MLVA)	14
1.6.4. <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST)	15
1.7. Isolamento de <i>Shigella sonnei</i> no Brasil	16
2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Linhagens bacterianas	23
4.2. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de <i>S. sonnei</i> por testes bioquímicos e sorologia	25
4.3. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	25
4.4. Pesquisa de genes de virulência por PCR	27

4.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	29
4.6. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	29
4.6.1. Preparação dos <i>plugs</i> de agarose	29
4.6.2. Lise celular dos <i>plugs</i> de agarose	30
4.6.3. Lavagem dos <i>plugs</i> de agarose	30
4.6.4. Digestão dos <i>plugs</i> de agarose	30
4.6.5. Corrida eletroforética	30
4.6.6. Análise do padrão de bandas gerado com os dados de PFGE	31
4.6.7. Construção do dendrograma de similaridade genética	31
4.7. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> PCR (ERIC-PCR)	31
4.7.1. Análise do padrão de bandas gerado com os dados de ERIC-PCR	32
4.7.2. Construção do dendrograma de similaridade genética	33
4.8. <i>Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis</i> (MLVA)	33
4.8.1. Análise dos picos gerados com os dados da eletroforese capilar	35
4.8.2. Construção do dendrograma de similaridade genética	36
4.9. <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST)	36
4.9.1. Análise dos dados de MLST (genes <i>housekeeping</i>)	37
4.9.2. Construção do diagrama de similaridade genética	38
4.10. Cálculo do índice de discriminação	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de <i>S. sonnei</i>	40
5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico	40
5.3. Genes de virulência por PCR	40
5.4. Teste de suscetibilidade a antimicrobiano	41
5.5. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	43
5.6. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> PCR (ERIC-PCR)	45
5.7. <i>Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis</i> (MLVA)	47
5.8. Similaridade genotípica, genes de virulência e perfil de resistência antimicrobianos	49
5.9. <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST)	52
5.9.1. Amplificação de genes <i>housekeeping</i>	52
5.9.2. Sequenciamento	52

5.9.3. Diagramas de similaridade genética gerado com os dados do MLST	53
6. Índice de discriminação	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	88
ANEXOS	94

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Shigella*

O gênero *Shigella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo e imóvel e é composto por quatro espécies que são *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella dysenteriae* (NATARO et al., 2011). *Shigella* spp. é um importante agente causador de diarreia e disenteria no mundo todo (ANGELINI et al., 2009; ANDERS et al., 2015; KAHSAIY e TEKLEMARIAM, 2015).

Patógenos transmitidos por alimentos, tais como *Salmonella enterica*, *E. coli* e *Shigella* spp. estão associados a alta taxa de infecções nos países em desenvolvimento, onde o saneamento básico e a falta de higiene são facilitadores da ocorrência de gastroenterites (AHMED e SHIMAMOTO, 2014).

Estima-se que ocorram 164,7 milhões de casos de shigelose anualmente, sendo que 163,2 milhões acontecem em países em desenvolvimento, portanto a situação é de endemia nestes locais e 1,5 milhões de casos em países industrializados (KOTLOFF et al., 1999; FARFÁN et al., 2010; KOPPOLU et al., 2013). *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* são as duas espécies de maior ocorrência no Brasil e no mundo e causas importantes de morbidade e mortalidade (FARUQUE et al., 2002; OJHA et al., 2013; SOUSA et al., 2013; UD-DIN et al., 2013; CRUZ et al., 2014).

No Brasil dentre os patógenos causadores de gastroenterite, *Shigella* spp. está entre as quatro bactérias mais isoladas de fezes diarreicas em regiões distintas do país, sendo que crianças são as mais afetadas (MEDEIROS et al., 2001; DINIZ-SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014).

O Ministério da Saúde (2010), estimou que a prevalência desse gênero bacteriano é de 8 a 10% em crianças menores de 1 ano de idade com diarreia, contudo em crianças com mais de 2 anos de idade esse número é ainda maior, sendo que a prevalência dessa bactéria é de 15 a 18%. Cerca de 2% dos surtos decorrentes de doenças transmitidas por alimentos e água notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo (CVE) são causados por *Shigella* spp., ou seja, em média 396 pessoas com shigelose todos os anos (CVE, 2013a).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 500.000 casos de shigelose anualmente (CDC, 2015).

Na África e no Sul da Ásia cerca de 88 milhões de casos de diarreia foram causados por *Shigella* spp. em 2010 e o número de mortes ocasionados em decorrência da shigelose é ≥ 40.000 nesses locais durante esse período (LAMBERTI et al., 2014).

A incidência da shigelose geralmente varia de acordo com a idade do indivíduo e com o índice de desenvolvimento humano (IDH). Crianças menores de cinco anos são as mais afetadas por essa doença, sendo que *Shigella* é altamente infecciosa mesmo em concentrações baixas (ANGELINI et al., 2009).

Shigella dysenteriae foi descoberta e posteriormente assim nomeada por um cientista japonês chamado Kiyoshi Shiga em 1897, devido a uma epidemia de disenteria no Japão. Nesse episódio, mais de 91.000 pessoas estavam doentes com um quadro clínico de fezes sanguinolentas (disenteria) e a taxa de mortalidade era $\geq 20\%$ (TROFA et al., 1999; HARDY e KOHLER, 2006).

Shigella spp. e *E. coli* são muito relacionadas geneticamente, entretanto são classificadas como gêneros bacterianos distintos. Para diferencia-los utiliza-se a pesquisa do gene *ipaH* por PCR que está presente em *Shigella* spp. e ausente em *E. coli* juntamente com testes bioquímicos (BELD e REUBSAET, 2012).

Bioquimicamente, o gênero *Shigella*, não produz gás a partir da fermentação de carboidratos, não descarboxila a lisina, não utiliza o acetato e não fermenta a lactose, com exceção da *S. sonnei* que pode fermentar este carboidrato com um tempo de incubação prolongado, assim sendo todas estas características a diferenciam de *Escherichia coli* (NATARO et al., 2011).

A classificação sorológica do gênero é realizada pelo antígeno somático (O) encontrado no lipopolissacarídeo presente na membrana externa da parede celular. *S. dysenteriae* subgrupo A é formada por 15 sorogrupos, *S. flexneri* subgrupo B é composta por 8 sorogrupos, *S. boydii* subgrupo C é constituída por 19 sorogrupos e *S. sonnei* subgrupo D apresenta somente um sorogrupo (NIYOGI, 2005; WHO, 2005; NATARO et al., 2011). Os sorogrupos são verificados a partir de uma reação antígeno-anticorpo, conhecida como sorotipagem, onde inicialmente se realiza uma aglutinação com soros polivalentes somáticos e posteriormente o sorotipo é pesquisado por testes com soros monovalentes (ZHANG et al., 2014).

1.2. *Shigella sonnei*

O isolamento de *S. sonnei* ocorre mais frequentemente em países industrializados em comparação à *S. flexneri* que ocorre mais frequentemente em países em desenvolvimento (Kotloff et al., 1999). Dados recentes demonstram que 2/3 das shigeloses diagnosticadas nos Estados Unidos são causadas por *S. sonnei*, principalmente, e também, em menor número, por *S. flexneri*. As outras espécies de *Shigella* são raras no país (CDC, 2013).

Na Europa, de acordo com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) *S. sonnei* foi isolada em 56% dos casos de shigelose entre 2010 e 2012. Neste período, mais de 7.000 casos foram confirmados por ano nos países europeus (ECDC, 2015).

Segundo Vinh e colaboradores (2009), apesar da incidência de *S. sonnei* estar estritamente relacionada com o desenvolvimento econômico e industrial de um determinado local, essa espécie vem se tornando muito isolada em países com poucas condições econômicas, como por exemplo, o Vietnã, no qual ocorreu uma mudança no cenário de isolamento de *S. sonnei*. Em 1995 e 1996 esta espécie foi isolada em menos da metade dos casos de shigelose do país, contudo a partir do ano 2000 *S. sonnei* assumiu a posição de espécie mais isolada. Portanto, atualmente *S. sonnei* é considerada emergente em países desenvolvidos, países em desenvolvimento e aqueles com baixíssima renda econômica (VINH et al., 2009; NYGREN et al., 2013; THE et al., 2016).

A mudança de panorama entre a incidência de *S. sonnei* e *S. flexneri* pode ser explicada por diferenças no genoma entre elas, sendo que *S. sonnei* se mostra geneticamente mais similar aos ancestrais de *E. coli* do que com as outras espécies de *Shigella*. Aparentemente, *S. sonnei* tem uma maior probabilidade de sobreviver e de se adaptar em diferentes ambientes e hospedeiros, por outro lado, *S. flexneri* perde plasmídeos mais facilmente do que qualquer outra espécie de *Shigella* e ainda é a espécie mais distante geneticamente de *E. coli* (HERSHBERG; TANG e PETROV, 2007; THOMPSON; DUY e BAKER, 2015).

S. sonnei pode ser diferenciada bioquimicamente das demais espécies por meio da reação de descarboxilação do aminoácido ornitina, uma vez que apenas *S. sonnei* será positiva para essa reação. Outra característica particular de *S. sonnei* é o seu crescimento em meios de cultura, sendo que essa pode aparecer de duas formas denominadas I e II, pois a forma I tem como característica colônias lisas e a forma II colônias rugosas, esta mudança de forma I para II é devido à perda de um plasmídeo de 120 MDa que é responsável pela produção do antígeno O dessa espécie (FERREIRA; CAMPOS e MARTINEZ, 2015).

1.3. Transmissão, manifestações clínicas e patogênese

De acordo com Niyogi (2005), usualmente *Shigella* spp. é transmitida pela ingestão de água e alimentos contaminados e/ou pelo contato pessoa-pessoa, pois os seres humanos são os únicos hospedeiros naturais desta bactéria.

No ambiente hospitalar esta bactéria pode ser transmitida por pacientes infectados, por pessoas colonizadas e pelos profissionais da saúde. Surtos ocasionados por *Shigella* nos hospitais, na comunidade e em creches são difíceis de controlar devido a sua rápida transmissão e a múltipla resistência aos antibióticos que está sendo relatada em muitas partes do mundo (NUNES et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

Shigelose é uma doença diarreica que ocorre devido à invasão bacteriana e destruição da mucosa intestinal, ocasionando uma resposta inflamatória grave (MORRIS et al., 2013). *Shigella* spp. se multiplica dentro das células epiteliais do cólon, portanto provocam a morte destas células e atingem as células epiteliais adjacentes do intestino, causando inflamação, sangramento e ulceração da mucosa (NIYOGI, 2005).

Desta maneira, os principais sintomas da shigelose são a diarreia e/ou disenteria, cólicas abdominais e tenesmo e o período de incubação da bactéria é de 12 a 48 horas (NIYOGI, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde (2010), a shigelose pode ser assintomática ou subclínica, grave e tóxica, sendo que a forma grave é caracterizada por dores abdominais que é uma manifestação clínica encontrada em 90% dos casos, febre e diarreia aquosa que após o período de 1 a 3 dias torna-se mucossanguinolenta, além de outros sintomas que podem aparecer como perda de peso, náuseas, vômitos, cefaleia, calafrios, convulsões e sinais meningíticos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a maioria dos pacientes se recupera dentro de 7 a 10 dias, contudo complicações como sepse, convulsões, prolapso retal e anormalidades metabólicas podem ocorrer (WHO, 2005).

S. sonnei está relacionada à diarreia dos viajantes em várias partes do mundo e sua virulência se deve a diversos genes que auxiliam na invasão das células epiteliais, devido ao sistema de secreção tipo III (T3SS). A expressão do sistema de secreção tipo III é estimulado em ambientes anaeróbicos, como por exemplo, o lúmen do trato gastrointestinal, assim sendo após uma série de modificações e rearranjos na célula hospedeira *Shigella* spp. consegue causar a infecção (SANSONETTI et al., 2006; MARTEYN et al., 2010).

1.4. Genes de virulência

A capacidade de *Shigella* spp. causar doença depende de genes contidos em um plasmídeo (pINV) de 220 Kb e de genes cromossômicos (CAMPOS; FERREIRA e SILVA, 2008). Os principais genes encontrados no plasmídeo de virulência de *Shigella* spp. são: *ipaH*, *ipaBCD*, *ial*, *virF*, *sen* e *sepA*. Os principais genes encontrados no cromossomo de *Shigella* spp. são: *ipaH*, *iuc*, *set1A*, *set1B*, *sat*, *pic* e *sigA* (Tabela 1) (CAMPOS; FERREIRA e SILVA, 2008; CRUZ et al., 2014).

O plasmídeo pINV tem uma região conservada denominada locus Mxi-Spa (30Kb), a qual codifica o sistema de secreção tipo III e genes que codificam os antígenos de invasão (*invasion plasmid antigens* - Ipas) (THE et al., 2016). Assim sendo, o plasmídeo de virulência é essencial para a patogenia de *Shigella* spp. e o sistema de secreção tipo III é caracterizado por injetar proteínas efetoras no interior das células intestinais do hospedeiro que permitem uma profunda interação entre as bactérias e as células hospedeiras (DONNENBERG, 2000; THE et al., 2016).

O sequenciamento do plasmídeo de virulência de *Shigella* spp. foi realizado por alguns pesquisadores para esclarecer a sua estrutura e as possíveis funções desse plasmídeo (BUCHRIESER et al., 2000; JIANG et al., 2005; THE et al., 2016). Durante esses estudos observou-se duas isoformas do plasmídeo de virulência do gênero *Shigella*, denominados pINVA e pINVB. A avaliação de três genes na região do Mxi-Spa (*mxiA*, *mxiC* e *ipgD*) foram os responsáveis por tais diferenças plasmidiais, sendo que houve divergências maiores nas sequências do gene *ipgD* do que dos genes *mxiA* e *mxiC* (LAN et al., 2001; THE et al., 2016).

De acordo com Lan e colaboradores (2001), *Shigella* spp. e EIEC evoluíram ao longo dos anos devido ao ganho de um plasmídeo pINV e a perda de funções catabólicas, sendo que essa perda está relacionada com a adaptação dos nichos que esses gêneros ocupam e não implicam em uma diminuição da virulência. Portanto, *Shigella* spp. e EIEC abrigam duas formas distintas do plasmídeo de virulência pINV o qual pode significar uma transferência lateral de genes ao longo da história. Ademais, a maioria das linhagens de EIEC e *S. dysenteriae* sorotipo 10 abrigam as isoformas do plasmídeo pINVA, enquanto *S. sonnei* abriga o pINVB, e ainda, existe a possibilidade de abrigar uma forma misturada de ambos os plasmídeos como ocorre com *S. dysenteriae* sorotipo 1, onde *ipgD* é derivado do pINVA e os genes *mxi* são derivados do pINVB (LAN e REEVES, 2002; LAN et al., 2004).

O gene de virulência *ipaH* está presente em inúmeras cópias no plasmídeo e no cromossomo de *Shigella* spp., este gene codifica proteínas envolvidas no processo de invasão da bactéria às células hospedeiras e na sobrevivência da bactéria em macrófagos (CRUZ et

al., 2014; FARSHAD; RANJBAR e HOSSEINI, 2015; LLUQUE et al., 2015). No total, *Shigella* spp. possui 12 genes *ipaH* formando uma família de proteínas que são altamente similares entre si, porém os locais de reconhecimento dos substratos são diferentes, ocasionando distintas funções durante a patogênese desse gênero bacteriano (ASHIDA e SASAKAWA, 2016).

De acordo com Cruz e colaboradores (2014), existem sete cópias do gene *ipaH* no cromossomo de *Shigella* spp. e cinco cópias no plasmídeo de virulência. O gene *ipaH* 7.8 tem um papel na modulação da resposta inflamatória decorrente da infecção de *Shigella* spp. Os genes de virulência *ipaH* 9.8, *ipaH* 4.5 e *ipaH* 0722 codificam proteínas envolvidas no processo de invasão de *Shigella* spp. às células epiteliais do hospedeiro (ASHIDA e SASAKAWA, 2016). Portanto, o gene *ipaH* é utilizado para a detecção e identificação do gênero *Shigella* em diferentes amostras (KINGOMBE; CERQUEIRA-CAMPOS e FARBER, 2005).

Os genes de virulência *ipa* (*ipaB*, *ipaC* e *ipaD*) são encontrados no plasmídeo de *Shigella* spp. e estão associados com a invasão nas células hospedeiras e consequentemente relacionados com a colite (CAMPOS; FERREIRA e SILVA, 2008). O gene *virB* é o ativador transcricional do operon *ipaBCD*, sendo o responsável pela expressão desses genes (GAO et al., 2013). As proteínas efetoras dos genes *ipaB*, *ipaC* e *ipaD* são necessárias para a ativação do sistema de secreção tipo III. Entre essas proteínas a *ipaB* tem um papel fundamental no controle do sistema de secreção tipo III, na apoptose de macrófagos, e ainda, auxiliam o escape da bactéria do fagossomo (DICKENSON et al., 2013; YANG et al., 2015).

Durante o processo de ativação do sistema de secreção tipo III, ocorre uma interação entre as *ipas* (*ipaB*, *ipaC* e *ipaD*). *IpaD* é a primeira proteína efetora a ser transportada para a ponta desse sistema, em seguida *ipaB* é convocada para o mesmo local, ficando inserida na membrana da célula do hospedeiro, após essa etapa há o recrutamento da proteína *ipaC*. Assim sendo, poros são formados na membrana celular do hospedeiro e por meio da translocação de outras proteínas efetoras de virulência, *Shigella* spp. consegue invadir as células hospedeiras (EPLER et al., 2009; YANG et al., 2015).

O gene *ial* (lôcus associado-invasão) é encontrado no plasmídeo pINV de *Shigella* spp. e codifica uma proteína relacionada ao processo de invasão da bactéria à célula hospedeira (DUTTA et al., 2001; DUTTA et al., 2014).

Segundo Dutta e colaboradores (2014), a pesquisa dos genes de virulência *ial* e *ipaH* por PCR podem fornecer uma rápida identificação dos casos de shigelose no mundo todo. Contudo, a localização desses genes é diferente, uma vez que o gene *ial* é encontrado apenas

no plasmídeo e o gene *ipaH* é encontrado em múltiplas cópias no plasmídeo e cromossomo de *Shigella* spp. Assim sendo, o gene *ial* é mais propenso a deleções espontâneas e provavelmente devido a essa diferença um número menor de linhagens são detectadas com esse gene quando comparadas com a presença do gene *ipaH* (LÜSCHER e ALTWEGG, 1994; THONG et al., 2005; SANGEETHA et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

De acordo com Gómez-Duarte; Bai e Newell (2009), o gene *virF* é plasmidial e um ativador de transcrição necessário para a expressão de genes de virulência relacionados à invasão de *Shigella* spp. e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) às células hospedeiras (KOPPOLU et al., 2013). A expressão dos genes de virulência *virB* e *icsA* é ativada pelo ativador transcricional *virF*. A principal função da proteína estrutural codificada pelo gene *icsA* é a colonização da bactéria na mucosa intestinal hospedeira (TRAN et al., 2011). O gene *virB* também é um ativador transcricional responsável pela expressão de genes de virulência relacionados com à invasão de *Shigella* spp. em células hospedeiras como o operon *ipa* e o locus Mxi-Spa (GAO et al., 2013).

A ativação do gene *virF* ocorre devido a diferenças nas condições ambientais da bactéria, por exemplo, temperatura, pH e osmolalidade (MAURELLI; BLACKMON e CURTISS, 1984; PORTER e DORMAN, 1994; NAKAYAMA e WATANABE, 1995). Segundo Nakayama e Watanabe (1995), o pH 7,4 estimula a expressão do gene *virF* e o pH 6,0 reprime a sua expressão. Quando *Shigella* spp. está em uma temperatura de aproximadamente 30°C a expressão do gene *virF* é de quatro a cinco vezes menor em comparação com a expressão desse gene a 37°C (FALCONI et al., 1998; YANG et al., 2015). Condições osmóticas inadequadas também reprimem a expressão desse importante fator transcricional do sistema de secreção tipo III em *Shigella* spp. (MITOBE et al., 2009).

Enterotoxinas podem ser sintetizadas a partir do gene plasmidial ShET-2 (*sen*) (VARGAS et al., 1999; SILVA et al., 2008). Segundo Sousa e colaboradores (2013), o gene *sen* codifica uma proteína de 62,8-kDa que foi inicialmente descrita em EIEC e pode ser encontrada também em linhagens do gênero *Shigella*.

As toxinas autotransportadoras serina protease (SPATEs) são comuns em membros da família *Enterobacteriaceae*. Filogeneticamente as SPATEs são divididas em duas classes denominadas classe 1 e classe 2, os genes cromossômicos *sat* e *sigA* fazem parte da classe 1 e são citotóxicas para as células epiteliais, o gene cromossômico *pic* e o gene plasmidial *sepA* fazem parte da classe 2 (BOISEN et al., 2012). Durante a fase inicial da infecção de *Shigella* spp. os genes *sigA*, *pic* e *sepA* realçam o poder de virulência da bactéria, ocasionando um grande acúmulo de fluidos no intestino do hospedeiro (THE et al., 2016).

O gene plasmidial *sepA* codifica enzimas associadas à invasão tecidual e pode promover a inflamação intestinal decorrente da infecção por *Shigella* spp. (BOISEN et al., 2009). Inicialmente, o gene *sepA* foi descrito em *S. flexneri* 2a, porém o modo de ação da proteína codificada por esse gene ainda não é bem descrito (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI e PARSOT, 1995; BOISEN et al., 2009). De acordo com Boisen e colaboradores (2012), o gene *sepA* não é encontrado apenas no gênero *Shigella*, existindo uma forte relação entre a presença desse gene e a diarreia causada por *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Sat é um gene cromossômico que codifica uma toxina autotransportadora secretada (SPATEs), e foi relatado primeiramente em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (GUYER et al., 2000; BOISEN et al., 2009). A proteína codificada por esse gene apresenta uma atividade serina protease exibindo um efeito citopático em células renais primárias e é capaz de estimular uma grande resposta de anticorpos depois da infecção por UPEC (GUYER et al., 2000).

A prevalência do gene *sat* entre as linhagens de *Shigella* spp. é diferente entre as duas principais espécies. *S. sonnei* pode apresentar esse gene, porém em quantidades sempre menores quando comparadas com *S. flexneri*, sendo que no total o número de linhagens de *S. flexneri* contendo o gene *sat* normalmente é mais que o dobro encontrado nas linhagens de *S. sonnei* (RUIZ e GASCÓN, 2002).

As proteases são sintetizadas pelos genes cromossômicos *sigA* e *pic*, responsáveis pela secreção de íons e pela atividade mucinase, respectivamente (YANG et al., 2005; BOISEN et al., 2009). Localizado em uma ilha de patogenicidade denominada *she* em *Shigella* spp., o gene *sigA* codifica uma proteína de 139,6-kDa capaz de degradar caseína e ser citopática para células intestinais (AL-HASANI et al., 2000; FAHERTY et al., 2012). O gene *pic* é localizado em um sítio instável da ilha de patogenicidade *she* de *S. flexneri* 2a e é encontrado em baixa frequência nessa espécie e alguns estudos demonstraram que os genes *pic* e *set1B* são sobrepostos codificados em cadeias opostas e que o gene *set1B* está dentro do *pic* (HENDERSON et al., 1999; AL-HASANI et al., 2001; ZHANG et al., 2013). Segundo Zhang e colaboradores (2013), o gene *pic* é multifuncional e está envolvido na patogênese entérica de EAEC, UPEC e *S. flexneri* 2a.

Localizado em uma ilha de patogenicidade no cromossomo de *Shigella* spp., o gene *iuc* está relacionado com a produção e o transporte da aerobactina (LAWLOR e PAYNE, 1984; VOKES et al., 1999). Todas as espécies de *Shigella* spp. apresentam sistemas capazes de adquirir ferro férrico por meio de sideróforos, como o codificado pelo gene *iuc*, sendo que

a sua expressão é influenciada pela concentração de ferro e pelo nível de oxigênio presente no ambiente. Os promotores do gene *iuc* são altamente expressos em condições aeróbias (WYCKOFF; BOULETTE e PAYNE, 2009).

Ademais, Kingombe e colaboradores (2005), propuseram a união da pesquisa dos genes de virulência *ipaH* e *iuc* por PCR para identificar corretamente as espécies de *Shigella* e *E. coli*, devido as linhagens do gênero *Shigella* sempre apresentarem esses genes. As linhagens de EIEC também demonstram o gene *ipaH*, mas o gene *iuc* é encontrado em menor número nas linhagens de EIEC.

As enterotoxinas também podem ser sintetizadas a partir do gene cromossômico ShET-1 (*set1A* e *set1B*) (VARGAS et al., 1999; SILVA et al., 2008). O complexo proteico codificado pelo gene ShET-1 tem aproximadamente 55-KDa, sendo que esse gene é composto por duas subunidades, uma subunidade A (*set1A*) e cinco subunidades B (*set1B*) (VARGAS et al., 1999; SOUSA et al., 2013). De acordo com Sangeetha e colaboradores (2014), as enterotoxinas sintetizadas pelos genes *set1A* e *set1B* são encontradas normalmente em linhagens de *S. flexneri* 2a e estão ausentes em linhagens de *S. sonnei*.

A principal função da família de enterotoxinas ShET-1 (*set1A* e *set1B*) e ShET-2 (*sen*) de *Shigella* spp. é a secreção de íons, porém essas enterotoxinas também podem exercer outras funções que ainda não são conhecidas (LLUQUE et al., 2015).

Tabela 1 - Características dos principais genes de virulência de *Shigella* spp.

Gene de Virulência	Principal Função	Localização
<i>ipaH</i>	Invasão	Múltiplas cópias no Plasmídeo e Cromossomo
<i>ial</i>	Invasão	Plasmídeo
<i>ipaBCD</i>	Invasão (Sistema de secreção tipo III)	Plasmídeo
<i>virF</i>	Ativador Transcricional de genes relacionados com a invasão	Plasmídeo
<i>sen</i>	Produção de Enterotoxinas	Plasmídeo
<i>sepA</i>	Enzimas associadas à invasão	Plasmídeo
<i>iuc</i>	Produção e Transporte de Aerobactina	Cromossomo
<i>set1A</i>	Produção de Enterotoxinas	Cromossomo
<i>set1B</i>	Produção de Enterotoxinas	Cromossomo
<i>sat</i>	Produz toxina autotransportadora	Cromossomo
<i>pic</i>	Atividade mucinase	Cromossomo
<i>sigA</i>	Secreção de íons	Cromossomo

1.5. Resistência a antimicrobianos

De acordo com Holt e colaboradores (2012), por meio do sequenciamento do genoma completo e de técnicas fenotípicas realizadas em linhagens de *S. sonnei* foi possível observar uma recente disseminação global dessas linhagens a partir da Europa. Os autores sugerem que ocorreu uma seleção de linhagens multidroga resistentes e que essas linhagens se disseminaram pelo resto do mundo.

O monitoramento de linhagens resistentes de *Shigella* spp. é essencial no Brasil e no mundo, pois este é necessário para que haja uma terapia eficiente quando esta é necessária (BASTOS e LOUREIRO, 2011; NUNES et al., 2012). Normalmente a shigelose é uma doença autolimitada, ou seja, não há necessidade do tratamento com antibiótico, contudo em muitos casos este é recomendado para que haja uma diminuição na taxa de transmissão, do tempo de excreção da bactéria e para evitar possíveis complicações do quadro clínico do paciente (GU et al., 2015).

Os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento da shigelose são principalmente ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, porém casos de resistência a esses antibióticos são cada vez mais corriqueiros. Portanto, quinolonas, cefalosporinas de terceira geração e tetraciclina também são indicadas para o tratamento da doença em várias partes do mundo (CDC, 2015; GU et al., 2015). Infelizmente, os números de linhagens multirresistentes de *Shigella* spp. estão aumentando, incluindo resistência às cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas e dessa maneira estudos que pesquisem o perfil de resistência de *Shigella* spp. são importantes para ajudar no monitoramento e controle dos casos desta doença (ZAIDI et al., 2013; QU et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

1.6. Métodos de tipagem molecular

Os testes fenotípicos são normalmente utilizados para o diagnóstico de shigelose na rotina, pela cultura de fezes do paciente em meios seletivos e diferenciais, sorotipagem e teste de suscetibilidade a antimicrobianos (NIYOGI, 2005; WHO, 2005). Contudo, tais testes são, muitas vezes, limitados por problemas de reprodutibilidade e pela sua capacidade reduzida de diferenciação entre linhagens de uma mesma espécie (OLIVE e BEAN, 1999).

Epidemiologicamente micro-organismos que estão envolvidos em surtos demonstram uma origem comum, ao contrário daqueles isolados de casos esporádicos (OLIVE e BEAN, 1999). Dessa forma, para aprofundar os estudos sobre a origem bacteriana e assim efetuar investigações epidemiológicas de surtos e/ou casos esporádicos de pessoas doentes, inúmeros métodos genotípicos foram desenvolvidos. A escolha de um ou mais métodos dentre vários

para a tipagem molecular bacteriana apresenta algumas particularidades que devem ser observadas de acordo com os objetivos, capacidade de discriminação entre as linhagens, custos, confiabilidade, reprodutibilidade e a capacidade de fornecer informações epidemiológicas consistentes (FOXMAN et al., 2005; FOLEY; LYNNE e NAYAK, 2009).

Vários métodos de tipagem molecular tais como *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR* (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA), *Multi-locus sequence typing* (MLST), entre outros, têm sido utilizados com sucesso nos estudos epidemiológicos de bactérias do gênero *Shigella* spp. (FOXMAN et al., 2005; GORGÉ et al., 2008; BOISEN et al., 2009; CAO et al., 2012; SERIBELLI et al., 2016).

1.6.1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) é considerada o padrão ouro na tipagem molecular de muitos patógenos bacterianos e tem como princípio básico a clivagem do DNA, utilizando enzimas de restrição de corte raro e assim originando fragmentos moleculares de comprimento grande. Foi descrita no início da década de 1980 com o objetivo de se estudar o DNA cromossômico de eucariotos (SCHWARTZ e CANTOR, 1984; FOXMAN et al., 2005).

Segundo o CDC (2016), o *PulseNet* desenvolve protocolos e utiliza alguns métodos genotípicos para subtipar linhagens bacterianas. O procedimento operacional padrão (POP) do PFGE no *PulseNet* para *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* não-O157 (STEC), *Salmonella* sorotipos, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* é o mesmo apresentando apenas pequenas diferenças entre os gêneros bacterianos acima citados.

Nessa técnica, a suspensão bacteriana fica envolvida na agarose originando assim os *plugs*. Posteriormente, esses *plugs* são lisados pelo uso da proteinase K e detergentes, sendo que a partir desse momento o DNA bacteriano fica livre e será digerido com enzimas de restrição de corte raro gerando aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição. Em seguida, os *plugs* são colocados em um gel de agarose e serão submetidos a uma corrida eletroforética em campo pulsado, ou seja, os pulsos elétricos vão se alternando em diferentes conjuntos de eletrodos, diferentemente de uma corrida convencional em que os pulsos elétricos seguem apenas uma direção (TENOVER; ARBEIT e GOERING, 1997; CDC, 2016).

A análise do padrão de bandas gerado pela técnica de PFGE é realizada através de *softwares* específicos que estabelecem uma similaridade genotípica entre as linhagens estudadas (SINGH et al., 2006; CDC, 2016).

De acordo com o CDC (2016), o PFGE é uma técnica amplamente utilizada para estudos epidemiológicos, altamente reprodutível e estável, e ainda, pode ser empregado para muitas bactérias através de diferentes enzimas de restrição. Contudo, como desvantagem essa técnica tem um alto custo com os equipamentos, materiais de consumo e elevado tempo para preparação dos *plugs* e corrida eletroforética. Durante as últimas décadas a técnica de PFGE tornou-se essencial no controle, prevenção e monitoramento de doenças bacterianas no mundo inteiro (PARIZAD; PARIZAD e VALIZADEH, 2016).

Em relação ao gênero *Shigella* trabalhos demonstraram que o PFGE tem um alto poder discriminatório e vem sendo utilizado na tipagem molecular em estudos epidemiológicos e sobre a diversidade genotípica dos isolados (ANGELINI et al., 2009; CHIOU et al., 2009; WANG et al., 2009; XIA et al., 2011; QU et al., 2012; UD-DIN et al., 2013; SERIBELLI et al., 2016).

1.6.2. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR)

A reação em cadeia de polimerase baseada na sequência intergênica repetitiva que é um palíndromo imperfeito de 127 pb e está presente em múltiplas cópias ao longo do genoma de enterobactérias e vibrios, denominada *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR) é uma técnica rápida que consegue ajudar nas investigações de surtos, na elucidação da transmissão da shigelose e usualmente têm validado os dados obtidos por PFGE (LIU et al., 1995; LEE et al., 2003; SURDEANU et al., 2003; WILSON e SHARP, 2006; PENATTI et al., 2007; KOSEK et al., 2012; SERIBELLI et al., 2016).

Hulton e colaboradores (1991), foram os primeiros pesquisadores a descreverem as sequências ERIC em *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium e em outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

As funções, origem e a evolução das sequências ERIC permanecem desconhecidas. Existem espécies bacterianas que não apresentam tais sequências, contudo já foram descritas em espécies estreitamente relacionadas como *Shigella* spp. e *E. coli*. Ademais, essas sequências podem ter funções que não são fundamentais ao crescimento e sobrevivência desses patógenos (WILSON e SHARP, 2006).

Segundo Wilson e Sharp (2006), a técnica de ERIC-PCR é realizada para distinguir linhagens bacterianas por meio de *primers* confeccionados a partir das sequências ERIC

presentes no genoma bacteriano. Portanto, a amplificação ocorrerá entre as cópias das sequências ERIC formando fragmentos de tamanhos variados que serão revelados em uma eletroforese convencional de gel de agarose (VERSALOVIC; KOEUTH e LUPSKI, 1991).

As sequências ERIC apresentam uma região central altamente conservada, a qual está localizada em regiões intergênicas e não codificantes do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH e LUPSKI, 1991). O número das sequências ERIC é variável entre os gêneros bacterianos, sendo que para *E. coli* K12 um total de 21 sequências foram encontradas no cromossomo dessa bactéria, porém para *Photorhabdus luminescens* incríveis 711 sequências foram descritas em seu cromossomo (DUCHAUD et al., 2003).

A técnica de ERIC-PCR é mais rápida e barata quando comparada ao PFGE, por isso em locais onde os recursos financeiros são limitados essa técnica pode auxiliar a epidemiologia de surtos e, além disso, também é uma técnica altamente reprodutível (KOSEK et al., 2012).

1.6.3. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

Na última década com o intuito de se avaliar os polimorfismos genéticos bacterianos, a tipagem dos *variable number of tandem repeats* (VNTRs) ganharam destaque, sendo que este é um método que avalia e compara repetições que ocorrem em *tandem* em diferentes linhagens de uma mesma espécie (LINDSTEDT, 2005). A análise de múltiplos *locus* de VNTRs é denominada *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) e é capaz de fornecer importantes dados epidemiológicos de diversos patógenos bacterianos (GORGÉ et al., 2008; CAMPIONI et al., 2013).

O MLVA demonstrou um bom poder discriminatório para tipar linhagens de *S. sonnei* isoladas de casos esporádicos e de surtos em várias partes do mundo, e desta forma, este método pode complementar os resultados obtidos com outras técnicas de tipagem molecular (RAWAL et al., 2010; KOH et al., 2012; CHIOU et al., 2013).

Essa técnica é relativamente rápida e aparentemente exige menos trabalho para ser realizada quando comparada com outras técnicas clássicas de tipagem molecular, sendo que produzem alto índice discriminatório entre as linhagens estudadas (LINDSTEDT et al., 2003; LINDSTEDT et al., 2007). Entretanto, segundo Chiou e colaboradores (2013), os resultados obtidos com a técnica de MLVA são difíceis de comparar entre laboratórios distintos, dificultando a investigação e vigilância de surtos em diferentes países.

Normalmente, a técnica de MLVA inicia-se com uma amplificação dos VNTRs por PCR que posteriormente são submetidos a uma eletroforese capilar realizada em aparelhos

para sequenciamento de DNA. Ademais, *primers* complementares às regiões das sequências VNTR marcados com vários fluoróforos também são requeridos por essa técnica (VERGNAUND e POURCEL, 2009). Por fim, *softwares* específicos convertem o tamanho do *amplicon* em alelos tipos que são analisados e a similaridade entre as linhagens estudadas é verificada (CDC, 2016).

Nadon e colaboradores (2013), propuseram um consenso internacional sobre o desenvolvimento, nomenclatura, validação e controle de qualidade para a técnica de MLVA utilizada para a detecção de surtos e da vigilância molecular de diferentes gêneros bacterianos. O *PulseNet* atualmente disponibiliza protocolos da técnica de MLVA para *E.coli* O157, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (CDC, 2016).

1.6.4. Multi-locus sequence typing (MLST)

A técnica de *Multi-locus sequence typing* (MLST) baseia-se na sequência de sete genes *housekeeping*, os quais fornecem dados que possibilitam comparar linhagens de *Shigella* spp. isoladas no mundo inteiro, devido a um banco de dados que utiliza um protocolo padrão de *E. coli* (TARTOF et al., 2005; CAO et al., 2012).

Neisseria meningitidis foi o primeiro patógeno tipado pela técnica de MLST em 1998, sendo que o objetivo dessa técnica era ser portátil, universal e fornecer uma caracterização definitiva das bactérias (MAIDEN et al., 2006). O MLST tem contribuído para os estudos que buscam o entendimento da biologia de patógenos e investigam a sua filogenia, evolução e epidemiologia (URWIN e MAIDEN, 2003).

Por meio de bancos de dados essa técnica armazena e interpreta sequências de nucleotídeos gerados pelo sequenciamento de sete genes *housekeeping*, sendo que as diferenças presentes nessas sequências encontradas entre as linhagens bacterianas são classificadas como alelos distintos. Para cada linhagem a análise conjunta dos sete alelos define o tipo de sequência, denominado *sequence type* (ST) (URWIN e MAIDEN, 2003; MAIDEN et al., 2006). Esses bancos de dados facilitam e permitem a comparação entre as linhagens que ali estão depositadas através de uma base de dados central que pode ser consultada em qualquer servidor da *web* (FEIL et al., 2004; CAO et al., 2012). De acordo com Feil e colaboradores (2004), os bancos de dados de MLST para diferentes patógenos permitem explorar e discernir o parentesco e a descendência evolutiva entre as linhagens estudadas.

Os resultados da técnica de MLST são altamente reprodutíveis, portáteis e fáceis de interpretar, contudo atualmente ele ainda é um método de tipagem molecular caro quando comparado com outras técnicas genotípicas (CAO et al., 2012).

S. sonnei é mais clonal e demonstra um ancestral comum quando tipada por MLST em comparação com outras espécies de *Shigella* spp. depositadas no banco de dados (CAO et al., 2012; SCHAUMBURG et al., 2015).

1.7. Isolamento de *Shigella sonnei* no Brasil

No Brasil, de acordo com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária (SCZ) *S. sonnei* é a segunda espécie do gênero *Shigella* mais isolada no país (SCZ, 2000; LIMA et al., 2015). Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) entre 2007 e 2010 quase 3 milhões de casos de diarreia e aproximadamente 40.000 surtos foram confirmados no Estado de São Paulo e desses cerca de 2 a 5% dos surtos notificados foram causados por *Shigella* spp. (CVE, 2013b).

Medeiros e colaboradores (2001), analisaram as fezes de 1.836 crianças com menos de 10 anos de idade, e relataram que *Shigella* spp. foi o segundo enteropatógeno mais isolado e que *S. sonnei* foi a espécie de *Shigella* com maior prevalência, isolada em 63,6% dos casos de shigelose, na região metropolitana de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo, uma área economicamente importante, com um poder socioeconômico elevado no Brasil (FREITAS e MORAES, 2010; MOESCH e BRIZOLLA, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (2010), no Brasil o perfil epidemiológico das doenças que são transmitidas por alimentos não são bem conhecidas e estudos sobre esse assunto não acontecem frequentemente no país, sendo que existem muitos Estados e municípios que não sabem a real incidência e as estatísticas dos principais agentes infecciosos que são transmitidos, como por exemplo, *Shigella* spp.

Shigelose não é uma doença de notificação compulsória no Brasil, assim sendo torna-se difícil a investigação da sua incidência e estudos sobre este assunto não ocorrem com frequência no país (PEIRANO; SOUZA e RODRIGUES, 2006).

A maioria dos estudos realizados no país investigou a ocorrência de *Shigella* em diferentes regiões e o perfil de resistência a antimicrobianos de tais linhagens (ORLANDI et al., 2001; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; PAULA et al., 2010; SOUSA et al., 2013). Há poucos estudos realizados que verificaram a diversidade genotípica e o potencial patogênico desse importante patógeno no Brasil (PENATTI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014; SERIBELLI et al., 2016).

Portanto, estudos que caracterizem molecularmente e verifiquem a suscetibilidade a antimicrobianos de linhagens de *S. sonnei* isoladas durante décadas no Brasil são de grande importância e deverão contribuir para um melhor entendimento da diversidade genotípica, bem como, fornecer importantes informações sobre o potencial patogênico e perfil de resistência desse importante patógeno bacteriano.

2. RELEVÂNCIA

2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO

A diarreia sanguinolenta é um grave problema de saúde pública, sendo que *Shigella* spp. é um importante agente desta doença, causando índices alarmantes de morbidade e mortalidade no mundo inteiro, principalmente entre as crianças (PENATTI et al., 2007; SOUSA et al., 2010; BASTOS e LOUREIRO, 2011; CDC, 2015).

As taxas mais altas de isolamento de *Shigella* spp. no Brasil ocorrem no Sudeste (40%) e Nordeste (34%), no Norte e Centro-Oeste as taxas são menores (13% e 10%, respectivamente) sendo que a taxa mais baixa entre as regiões do Brasil é encontrada no Sul (3%) (PEIRANO; SOUZA e RODRIGUES, 2006). De acordo com o Ministério da Saúde (2010), a monitoração dos casos esporádicos e surtos de shigelose são de grande importância e, além disso, devem-se realizar atividades voltadas para o conhecimento e divulgação da doença a fim de minimizar a sua incidência e letalidade.

No Brasil há poucos estudos de tipagem molecular com esta bactéria e casos desta doença são desconsiderados em muitas regiões do país, por não ser uma doença de notificação compulsória e também por apresentar casos subnotificados, apesar da shigelose ser uma causa grave de morbidade e mortalidade em muitos países (LIMA et al., 1997; PENATTI et al., 2007; ANGELINI et al., 2009; CVE, 2009). Há poucos estudos no país que avaliaram a presença de marcadores de virulência e tiparam molecularmente linhagens de *Shigella sonnei* (PENATTI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014). Ademais, um número relativamente baixo de estudos explorou o perfil de linhagens resistentes a antimicrobianos de *Shigella* spp. no Brasil (PEIRANO; SOUZA e RODRIGUES, 2006; PAULA et al., 2010; BASTOS e LOUREIRO, 2011; NUNES et al., 2012; SOUSA et al., 2013).

Devido à escassez de estudos de caracterização molecular e de resistência a antimicrobianos envolvendo *S. sonnei* isoladas no Brasil, estudos que abordem diferentes aspectos da biologia, genética e epidemiologia dessa espécie são de grande importância (LIMA et al., 1997; PENATTI et al., 2007; ANGELINI et al., 2009; SERIBELLI et al., 2016).

Dessa forma, a realização desse projeto objetivou a pesquisa de genes de virulência, a caracterização genotípica e do perfil de resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. sonnei* isoladas de humanos no período de 1983 a 2014 em várias cidades da Região metropolitana de Ribeirão Preto com o intuito de ajudar no entendimento da diversidade genotípica, potencial patogênico e perfil de resistência de *S. sonnei* isoladas durante três décadas no Estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar linhagens de *S. sonnei* isoladas de humanos com gastroenterite, durante três décadas no Estado de São Paulo, quanto à sua diversidade genotípica, potencial patogênico e perfil de resistência a antimicrobianos.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o potencial patogênico das linhagens pela pesquisa dos genes *ipaH*, *ipaBCD*, *ial*, *set1A*, *set1B*, *sen*, *sat*, *iuc*, *sepA*, *sigA*, *virF* e *pic* por PCR;
- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos por disco difusão nas linhagens a serem estudadas;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *S. sonnei* a serem estudadas por PFGE, comparando os isolados de diferentes anos;
- Analisar a diversidade genotípica das mesmas linhagens de *S. sonnei* por ERIC-PCR, comparando os isolados de diferentes anos;
- Analisar a diversidade genotípica de tais linhagens de *S. sonnei* por MLVA, comparando os isolados de diferentes anos;
- Analisar a diversidade genotípica de algumas linhagens de *S. sonnei* por MLST;
- Correlacionar similaridade genética, presença ou ausência de genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos das *S. sonnei* estudadas;
- Avaliar o poder discriminatório dos métodos utilizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Nesse estudo foram analisadas 72 linhagens de *S. sonnei* provenientes da coleção de cultura do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL-RP) isoladas de humanos no período de 1983 a 2014 em várias cidades da Região metropolitana de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (Protocolo CEP/FCFRP nº 369).

É importante ressaltar que essas amostras foram criteriosamente escolhidas a partir dos dados catalogados pelo IAL-RP de modo a garantir que não houvesse mais de um isolado bacteriano por amostra de fezes e que essas fossem representativas do período estudado. Pelas informações contidas no prontuário dos pacientes ficou evidenciado que todas as amostras eram provenientes de indivíduos diferentes.

As linhagens foram cultivadas, caracterizadas e estocadas pelo IAL-RP. Os acervos estão crio-preservados, com armazenamento em *freezer* -80°C. A Tabela 2 mostra de forma mais detalhada as características das 72 linhagens de *S. sonnei* estudadas.

Tabela 2 - Características das 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas isoladas de fezes diarreicas de humanos com shigelose de 1983 a 2014

Linhagens	Data de Isolamento	Local de Isolamento	Fonte
<u>Sn 01*</u>	<u>1983</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 02</u>	<u>1983</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 03</u>	<u>1983</u>	<u>Barretos</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 04*</u>	<u>1984</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 05</u>	<u>1984</u>	<u>Sertãozinho</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 06</u>	<u>1984</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 07</u>	<u>1985</u>	<u>Santa Rita do Passa Quatro</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 08</u>	<u>1985</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 09</u>	<u>1986</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 10</u>	<u>1986</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 11</u>	<u>1987</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 12</u>	<u>1987</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 13</u>	<u>1988</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 14*</u>	<u>1988</u>	<u>Cajuru</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 15</u>	<u>1988</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 16*</u>	<u>1988</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 17</u>	<u>1989</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 18</u>	<u>1989</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 19*</u>	<u>1990</u>	<u>Bonfim Paulista</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 20</u>	<u>1990</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 21*</u>	<u>1990</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>

Continua

Continuação

Linhagens	Data de Isolamento	Local de Isolamento	Fonte
Sn 22	1991	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 23	1991	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
<u>Sn 24*</u>	<u>1991</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 25*</u>	<u>1992</u>	<u>Cajuru</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 26	1992	Jaboticabal	Caso Esporádico
<u>Sn 27*</u>	<u>1992</u>	<u>Cravinhos</u>	<u>Caso Esporádico</u>
<u>Sn 28*</u>	<u>1992</u>	<u>Cajuru</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 29	1992	Araraquara	Caso Esporádico
<u>Sn 30*</u>	<u>1993</u>	<u>Severínia</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 31	1993	Jaboticabal	Caso Esporádico
Sn 32	1994	Jaboticabal	Caso Esporádico
Sn 33	1994	Jaboticabal	Caso Esporádico
Sn 34	1994	Cajuru	Caso Esporádico
Sn 35	1994	Cajuru	Caso Esporádico
Sn 36	1995	Jaboticabal	Caso Esporádico
Sn 37	1995	Jaboticabal	Surto1
Sn 38	1995	Jaboticabal	Surto1
Sn 39	1995	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 40	1996	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 41	1996	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 42	1997	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
<u>Sn 43*</u>	<u>1997</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 44	1997	Sales Oliveira	Caso Esporádico
Sn 45	1998	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
<u>Sn 46*</u>	<u>1998</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 47	1999	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 48	1999	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 49	2000	Barrinha	Surto2
Sn 50	2000	Barrinha	Surto2
<u>Sn 51*</u>	<u>2000</u>	<u>Barrinha</u>	<u>Surto2</u>
Sn 52	2001	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 53	2001	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 54	2002	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
<u>Sn 55*</u>	<u>2002</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 56	2002	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
<u>Sn 57*</u>	<u>2003</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 58	2003	Ribeirão Preto	Caso Esporádico
Sn 59	2004	Sertãozinho	Caso Esporádico
<u>Sn 60*</u>	<u>2004</u>	<u>Ribeirão Preto</u>	<u>Caso Esporádico</u>
Sn 61	2005	Taiacu	Caso Esporádico
Sn 62	2006	Barrinha	Surto3
Sn 63	2006	Barrinha	Surto3
Sn 64	2006	Barrinha	Surto3
Sn 65	2006	Altinópolis	Surto4
Sn 66	2006	Altinópolis	Surto4
Sn 67	2008	Franca	Surto5
Sn 68	2008	Franca	Surto5

Continua

Conclusão

Linhagens	Data de Isolamento	Local de Isolamento	Fonte
<u>Sn 69*</u>	<u>2014</u>	<u>Barretos</u>	<u>Surto6</u>
<u>Sn 70*</u>	<u>2014</u>	<u>Barretos</u>	<u>Surto6</u>
<u>Sn 71*</u>	<u>2014</u>	<u>Barretos</u>	<u>Surto6</u>
Sn 72	2014	Pitangueiras	Surto7

MLST – realizado apenas para as linhagens sublinhadas e com *

4.2. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de *S. sonnei* por testes bioquímicos e sorologia

A reconfirmação da espécie foi feita para todas as 72 linhagens de *S. sonnei* descritas na Tabela 2. As linhagens foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia) a 37°C por 24 horas. O isolamento das colônias foi realizado em ágar MacConkey (Himedia), após a semeadura por esgotamento de uma alçada do caldo BHI no meio sólido e foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os testes bioquímicos realizados com as colônias isoladas foram em TSI (*Triple Sugar Iron*), EPM, MILi e Citrato de Simmons.

O ágar TSI é amplamente utilizado para a identificação de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo que este permite a diferenciação das bactérias fermentadoras de glicose, lactose e/ou sacarose e também a detecção da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). O meio EPM é empregado quanto à fermentação da glicose, produção de gás e H₂S, hidrólise da ureia e desaminação do triptofano (Anexo I). O meio MILi é semissólido e este permite a visualização da motilidade, descarboxilação da lisina e produção do indol (Anexo II). O meio Citrato de Simmons analisa a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono pelas bactérias. Portanto, os quatro meios de cultura acima citados reúnem testes bioquímicos suficientes para a caracterização de *Shigella* spp. As linhagens que apresentaram características bioquímicas compatíveis com *Shigella* spp. foram crio-preservadas em freezer -80°C com caldo BHI e 20% de glicerol.

A sorotipagem foi feita por soro-aglutinação em lâmina para as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2 com o soro polivalente para *S. sonnei* (Probac do Brasil) e duas linhagens (*S. flexneri* ATCC 12022 e *S. sonnei* ATCC 25931) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente durante a realização da sorotipagem.

4.3. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

O DNA genômico das 72 linhagens de *S. sonnei* descritas na Tabela 2 foi extraído segundo protocolo de Campioni e Falcão (2014). O DNA genômico extraído foi utilizado, na pesquisa dos genes de virulência e nas técnicas de ERIC-PCR, MLVA e MLST.

Todas as linhagens de *S. sonnei* foram crescidas em 4 mL de caldo BHI (Himedia) a 37°C por 24 horas. Após isso, houve a centrifugação (14.000 rpm por 3 minutos em centrífuga 5810 R Eppendorf) para a formação de sedimento bacteriano. Ressuspendeu-se o sedimento em 250 µL de solução I gelada (20% de sacarose, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM EDTA). Incubou-se em gelo durante 10 minutos.

Em seguida, as células bacterianas foram lisadas com 500 µL de solução II gelada (50 mM NaCl e 1% de sarcosil) + proteinase K (adicionado 25 µL de proteinase K 20 mg/mL para cada 10 mL de solução II). Incubou-se em Banho-Maria a 37°C por 2 horas.

Posteriormente, adicionou-se 750 µL de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25 mL Fenol; 24 mL Clorofórmio; 1 mL Álcool Isoamílico) e agitou-se muito bem cada tubo de polipropileno de fundo cônico de 2,0 mL. Posteriormente, centrifugou-se essa mistura por 14.000 rpm por 10 minutos (centrífuga 5810 R Eppendorf) e coletou-se o sobrenadante e o transferiu para um novo tubo de polipropileno de fundo cônico de 2,0 mL. Adicionou-se 750 µL Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24 mL Clorofórmio; 1 mL Álcool Isoamílico) e agitou-se novamente muito bem cada tubo de polipropileno de fundo cônico de 2,0 mL. Seguidamente, centrifugou-se essa mistura por 14.000 rpm por 10 minutos (centrífuga 5810 R Eppendorf) e novamente coletou-se o sobrenadante e o transferiu para um novo tubo de polipropileno de fundo cônico de 2,0 mL.

Adicionou-se 1 mL de etanol a 4°C e o DNA foi precipitado em gelo durante 15 minutos. Adiante, centrifugou-se para obtenção do sedimento por 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C (centrífuga 5810 R Eppendorf). Desprezou-se o sobrenadante com muito cuidado e secou-se o sedimento em *Speed-Vac* (Concentrator 5301, Eppendorf). Suspendeu-se o sedimento em 400 µL de água destilada ultra pura (livre de DNase e RNase, Invitrogen) e foram adicionados 2 µL de RNase 50 µg/mL, incubados em Banho-Maria a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi avaliada em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. Em 5 µL do DNA extraído foram adicionados 2 µL de solução azul de bromofenol (40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.) para corrida eletroforética realizada a 80 Volts por 90 minutos. Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos, e observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

A concentração e a pureza do DNA genômico extraído foram analisadas em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) com comprimentos de onda (λ) de 260 nm e 280 nm (Sambrook e Russell, 2001). Foram consideradas como boas as extrações

de pureza $\geq 1,8$ ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Para amostras abaixo desse valor uma nova extração de DNA foi realizada.

4.4. Pesquisa de genes de virulência por PCR

Foi realizada para todas as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2. Os 12 genes de virulência pesquisados foram *ipaH* e *iuc* conforme descrito por Kingombe e colaboradores (2005); *ipaBCD* conforme descrito por Faruque et al. (2002); *ial* conforme descrito por Frankel et al. (1989); *set1A* e *set1B* conforme descrito por Fasano et al. (1995); *sen* conforme descrito por Farfán et al. (2010); *sat*, *sigA*, *pic* e *sepA* conforme descrito por Boisen et al. (2009) e *virF* conforme descrito Vidal et al. (2005). As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 μL , conforme a Tabela 3 que mostra de forma detalhada todos os reagentes e suas concentrações utilizadas para a amplificação dos genes de virulência.

Tabela 3 - Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência por PCR

Componentes	VOLUME (μL)	Concentração Final
10X Tampão Taq com KCl ^a	5	1X
25 mM MgCl ₂ ^a	2	2 mM
10 mM dNTP ^b	1	0,2 mM cada dNTP
primers F	2,5	25 pmol
primers R	2,5	25 pmol
Platus Taq DNA Polimerase ^a	0,5	1U
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^b	q.s.p.-50	_____
DNA	5	50 ng

^a Produto Sinapse; ^b Produto Invitrogen

Reações sem DNA foram utilizadas como branco, como controle negativo uma linhagem de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e como controles positivos as linhagens *S. flexneri* ATCC 12022 e *S. sonnei* ATCC 25931. O termociclador utilizado para a amplificação dos genes foi o Mastercycler da marca Eppendorf.

As condições das reações de amplificação para os genes pesquisados foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA- 94°C por 45 segundos;

- Hibridação dos *primers* - X°C por 45 segundos (X = temperatura de hibridação);
- Extensão - 72°C por 1 minuto.

Após os 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

As sequências dos *primers*, sua temperatura de hibridação e o tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – *Primers* utilizados na PCR para a amplificação dos genes relacionados à virulência nas 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas, tamanho dos produtos de amplificação e temperaturas de hibridação

Genes	Sequência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Temperatura de Hibridação (°C)
<i>ipaH</i>	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	629	68
<i>ipaBCD</i>	GCTATAGCAGTGACATGG ACGAGTTCTGAAGCACTC	612	59
<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAATTATTTCC	320	57
<i>set1A</i>	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGGTA	309	55
<i>set1B</i>	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAATGACG	147	53
<i>sen</i>	TTGCATCAGCCTGTCCATTA AAAACGGTTCATGGGGAGAT	968	52
<i>sat</i>	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	930	57
<i>iuc</i>	CAGACGCAGGTCCTCTCTCATA GCTCGCTACCAGTCACACACTT	222	68
<i>virF</i>	AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	618	61
<i>sepA</i>	GCAGTGGAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	58
<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	430	60
<i>pic</i>	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT GACTTAATGTCACTGTTCAGCG	572	60

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com o tampão TAE 1X. O marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen) foi colocado em cada corrida eletroforética de todos os genes de virulência pesquisados. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos, observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O teste de suscetibilidade foi realizado para as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2 utilizando o método de disco difusão. A escolha dos antimicrobianos foi baseada no *Clinical Laboratory Standards Institute* - CLSI (2014) e nos antimicrobianos analisados por Paula et al. (2010); Bastos e Loureiro (2011); Nunes et al. (2012) e Zhang et al. (2014). Após o crescimento em caldo BHI (Himedia) a 37°C por 24 horas as linhagens de *S. sonnei* foram semeadas em placas de Petri (90x15mm) com ágar Müeller-Hinton (Himedia) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, uma suspensão de cada linhagem em solução salina 0,8% foi realizada até que atingissem a escala 0,5 de McFarland. Com um *swab* as linhagens foram semeadas em placas de Petri (150x15mm) com ágar Müeller-Hinton (Oxoid) e discos impregnados com os antibióticos (Oxoid) descritos abaixo foram colocados sobre as placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas com posterior leitura dos halos de inibição. A interpretação do teste foi realizada de acordo com as normas de procedimento do CLSI (2014). Linhagens que foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes foram definidas como multidroga resistentes (MDR) (SCHWARZ et al., 2010; MAGIORAKOS et al., 2012).

Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (30µg), ampicilina (10µg), gentamicina (10µg), amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), cefepime (30µg), cefotaxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), levofloxacina (5µg), imipenem (10µg), ampicilina-sulbactam (20µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25µg), ceftazidima (30µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), ofloxacina (5µg) e piperacilina (100µg). A linhagem *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos discos.

4.6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

4.6.1. Preparação dos *plugs* de agarose

A técnica de PFGE foi realizada para todas as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2. Os *plugs* de agarose contendo o DNA genômico das linhagens foram preparados seguindo o protocolo descrito por Ribot et al. (2006).

Inicialmente as linhagens cresceram de 12-18 horas em 3,0 mL de caldo BHI (Himedia) a 37°C por 24 horas. Após isso, a semeadura das linhagens foi feito em ágar TSA (Tryptona Soja Ágar) (Kasvi) incubado a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado a 3 mL do tampão de suspensão de células (100mM Tris; 100mM EDTA) até atingirem a D.O._{610nm} de 0,8 – 1,0. As suspensões foram colocadas em gelo para cessar o crescimento bacteriano. Em seguida, transferimos 200 µL da suspensão de células para um

tubo de 2 mL para cada amostra e estes foram colocados em banho seco a 60°C. Foram adicionados 10 µL de proteinase K (20mg/mL) e 200 µL de 1% de agarose *Seakem Gold* (Lonza) em cada tubo com a suspensão de células. Essas misturas foram transferidas para os pocinhos dos moldes (70-80 µL por poço) lembrando-se de evitar a formação de bolhas durante esse processo. Esperou-se a solidificação dos *plugs* em temperatura ambiente (10-15 minutos) ou em geladeira (4°C – 5 minutos).

4.6.2. Lise celular dos *plugs* de agarose

Os *plugs* de agarose foram transferidos para tubos de polipropileno de fundo cônico tipo “falcon” de 15 mL e 5 mL de tampão de lise celular (50mM Tris; 50mM EDTA; pH 8,0 + 1% sarcosil) e 25 µL de proteinase K (20mg/mL) foram adicionados em cada tubo, posteriormente foram incubados em Banho-Maria a 54°C por 2 horas. Após esse tempo, os tubos foram retirados do Banho-Maria e agitados vigorosamente por 30 minutos.

4.6.3. Lavagem dos *plugs* de agarose

Durante essa etapa todo o tampão de lise celular foi removido e 2 lavagens com 10 mL de água MilliQ pré-aquecida (54°C) foram realizadas por 15 minutos. Após esse tempo toda a água foi removida e 4 lavagens com 10 mL de Tampão TE (10mM; 1mM EDTA; pH 8,0) também pré-aquecido a 54°C por 15 minutos aconteceram em cada tubo “falcon”. Depois das 6 lavagens os *plugs* de agarose foram estocados em 1 mL de Tampão TE em tubos de 2mL a 4°C-8°C.

4.6.4. Digestão dos *plugs* de agarose

Um *plug* de agarose foi separado em tubo de 2 mL e acrescentou-se 1 mL de tampão TE pré-aquecido a 54°C, lavando 3 vezes por 15 minutos sob uma leve agitação. Removeu-se todo o tampão TE e 300 µL do tampão comercial da enzima 1X foram adicionados, lavando os *plugs* por 30 minutos a temperatura ambiente sob uma leve agitação. A digestão do DNA bacteriano contido nos *plugs* foi feita com 50U da enzima de restrição *XbaI* (Invitrogen - Life Technologies) durante 2 horas a 37°C.

4.6.5. Corrida eletroforética

Foram pesados 1,5g de agarose *Seakem Gold* (Lonza) e dissolvidos em 150 mL de tampão TBE 0,5X (45mM Tris; 45mM Ácido bórico; 1mM EDTA) para a confecção do gel de agarose. Durante a corrida eletroforética o tampão TBE 0,5X também foi utilizado

totalizando 2500 mL de preparo. Para selar os *plugs* que foram colocados no gel, 2 mL da agarose fundida haviam sido separados e colocados no banho seco 60°C até o momento do uso.

Os fragmentos da macrorestrição foram submetidos à corrida eletroforética de campo pulsado em programa de 1 bloco no aparelho CHEF-DRIII system (Bio-Rad), sob as seguintes condições: pulso inicial de 2,2 segundos, pulso final de 54,2 segundos, voltagem de 6 v/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 19 horas, conforme descrito por Ribot et al. (2006).

O marcador de peso molecular utilizado foi a linhagem *Salmonella* Braenderup H9812 digerida por *XbaI* (Invitrogen - Life Technologies) durante 2 horas a 37°C. Após as corridas, os fragmentos foram corados por 30 minutos com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), descorados em água por 90 minutos, observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.6.6. Análise do padrão de bandas gerado com os dados de PFGE

A análise dos dados foi feita utilizando o *software* BioNumerics versão 7.6 (Applied Maths). Para a técnica de PFGE, somente as bandas entre 28,8 e 668,9 Kb em tamanho foram incluídas na análise. *Salmonella* Braenderup H9812 foi digerida com 40U da enzima de restrição *XbaI* (Invitrogen - Life Technologies) a 37°C durante 2 h e utilizada como padrão de peso molecular, essa linhagem foi incluída três vezes em cada gel para normalizar as imagens e permitir comparações entre os diferentes géis.

4.6.7. Construção do dendrograma de similaridade genética

A construção do dendrograma de similaridade foi realizada utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o índice DICE para o cálculo de similaridade, conforme descrito por Souza et al. (2010), com poucas modificações.

4.7. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR)

As sequências ERIC foram amplificadas para todas as 72 linhagens de *S. sonnei* descritas na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL. A Tabela 5 traz de forma detalhada os reagentes e as concentrações utilizadas na reação de ERIC-PCR. Os *primers* utilizados foram: ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'), conforme descrito por Versalovic; Koeuth e Lupski (1991).

Tabela 5 - Descrição dos reagentes utilizados na reação de ERIC-PCR

Componentes	Volume (µL)
10X Ex Taq Buffer ^a	5
dNTP mixture (2,5 mM cada) ^a	4
0,2-1,0 µM <i>primer F</i>	5
0,2-1,0 µM <i>primer R</i>	5
Takara Ex Taq (5U) ^a	0,25
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^b	q.s.p.-50
DNA (100-500 ng)	1

^a Produto Takara; ^b Produto Invitrogen

As condições das reações de amplificação foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 98°C por 10 segundos, seguido por 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA- 98°C por 10 segundos;
- Hibridação dos *primers* - 55°C por 30 segundos;
- Extensão - 72°C por 1 minuto.

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação de ERIC-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 80V por 3,0 horas, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos e descorados em água por 1 hora, visualizados por transluminador ultravioleta e registrados em *software* fotográfico. As reações de PCR foram feitas em duplicata para verificar a reprodutibilidade das reações de amplificação.

4.7.1. Análise do padrão de bandas gerado com os dados de ERIC-PCR

A análise filogenética dos dados foi feita utilizando-se o *software* Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths). Para a técnica de ERIC-PCR, somente as bandas entre 300 e 5000 pb em tamanho foram incluídas na análise. Um padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen) foi incluído três vezes em cada gel com o intuito de normalizar as imagens e permitir comparações entre os diferentes géis.

4.7.2. Construção do dendrograma de similaridade genética

A construção do dendrograma foi realizada utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, segundo as instruções do manual do programa.

4.8. *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA)

A técnica de MLVA foi realizada para todas as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2.

A tipagem por MLVA foi realizada segundo protocolo descrito por Liang et al. (2007). Oito *loci* previamente selecionados foram amplificados por PCR utilizando-se *primers* marcados com diferentes fluoróforos específicos para cada *locus* de acordo com Chiou et al. (2013). Foram realizadas três reações de PCR para cada linhagem com um volume final de 10 µL cada, reação 1 (R1) com *primers* SS1, SS10 e SS11, reação 2 (R2) com *primers* SS3, SS6, SS9 e SS23 e reação 3 (R3) com *primers* SS13 (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 6 - Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos *loci* SS1, SS10 e SS11

Componentes	Volume (µL)
10X High Fidelity PCR Buffer ^a	1
50 mM MgSO ₄ ^a	0,4
200 µM dNTP ^a	0,2
<i>primers</i> F	0,25 ^b
<i>primers</i> R	0,25 ^b
Taq DNA Polimerase High Fidelity ^a	0,2
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-10
DNA	1

^a Produto Invitrogen; ^b *primers* SS1 (0,05 µL), SS10 (0,1 µL) e SS11 (0,1 µL)

Tabela 7 - Descrição dos reagentes utilizados na PCR dos *loci* SS3, SS6, SS9 e SS23

Componentes	Volume (µL)
10X High Fidelity PCR Buffer ^a	1
50 mM MgSO ₄ ^a	0,4
200 µM dNTP ^a	0,2
<i>primers</i> F	0,45 ^b
<i>primers</i> R	0,45 ^b
Taq DNA Polimerase High Fidelity ^a	0,2
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-10
DNA	1

^a Produto Invitrogen; ^b *primers* SS3 (0,1 µL), SS6 (0,2 µL), SS9 (0,05 µL) e SS23 (0,1)

Tabela 8 - Descrição dos reagentes utilizados na PCR do *loci* SS13

Componentes	Volume (µL)
10X High Fidelity PCR Buffer ^a	1
50 mM MgSO ₄ ^a	0,4
200 µM dNTP ^a	0,2
<i>primers</i> F	0,05 ^b
<i>primers</i> R	0,05 ^b
Taq DNA Polimerase High Fidelity ^a	0,2
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-10
DNA	1

^a Produto Invitrogen; ^b *primers* SS13 (0,05 µL)

A Tabela 9 traz os *primers* marcados na extremidade 5' com diferentes fluoróforos utilizados nessa técnica, bem como os *loci* VNTR pesquisados.

Tabela 9 - *Primers* utilizados para a metodologia de MLVA na tipagem de *Shigella sonnei*

Locus	Loci VNTR	Primers	Sequências dos primers (5'-3')
SS1	ATGCGCC	SS1F SS1R	VIC-TTGCCAGTACACCTCACTCG GCGTCGGCGTTAATATCACT
SS3	CATTCAA	SS3F SS3R	6- FAM-CTGGGAGATGAACAGGAGGA ATGCCAGCGACAAGTTTCTT
SS6	AGAAAGC	SS6F SS6R	NED-GAGTCGCTAAACGCTTGCTT GGGAAATAGAGCGGACCTTT
SS9	TGCAGG	SS9F SS9R	VIC-CGCAATCAGCAAAACAAAGA GCGATGCTGGAAAACTGAT
SS10	AGAGGA	SS10F SS10R	6- FAM-ACGGTGGGCTTTCTCTACCT GCGAGGGGGAGATCAGTATT
SS11	AGTCAG	SS11F SS11R	NED-CTGGTCCGGGAGATTATCG CTGTTTCAGCGGTCTCTTCC
SS13	GCTGGT	SS13F SS13R	VIC-AGACGCTGGCTTATGACGAT GCCACTGTCCTGAATGGTCT
SS23	GTTAACGCTTAC CTCC	SS23F SS23R	PET-CTGGCTTAATGGCTACATAC CGCATGAGCGTGTGTGTAATG

Reações sem DNA foram usadas como controle negativo.

O termociclador utilizado para o ensaio de PCR foi o *DNA Engine Peltier Thermal Cycler* da Marca BioRad.

As condições das reações de amplificação foram as seguintes:

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA - 94°C por 45 segundos;
- Hibridação dos *primers* - 55°C por 50 segundos;
- Extensão - 72°C por 1 minuto.

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os *amplicons* após a PCR foram diluídos em água DNase e RNase free (Gibco) na proporção de 1:100v/v e a 1 µL dessa diluição foi acrescido 10 µL de formamida e 0,5 µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystem). Depois da desnaturação por aquecimento os *amplicons* foram separados por eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500xL (Applied Biosystem) utilizando filtro G5 e matriz DS-33, de acordo com as instruções do fabricante.

4.8.1. Análise dos picos gerados com os dados da eletroforese capilar

O tamanho dos fragmentos, gerados após a eletroforese capilar, foram convertidos em números de repetições e analisados com o *software* Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths).

Os picos gerados foram identificados de acordo com a marcação utilizada para cada *loci* VNTR.

4.8.2. Construção do dendrograma de similaridade genética

A construção do dendrograma foi realizada utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice *categorical values*, segundo as instruções do manual do programa.

4.9. Multi-locus sequence typing (MLST)

Um total de 20 linhagens de *S. sonnei* isoladas de humanos foram tipadas por MLST. Estes isolados foram escolhidos com base nos dendrogramas construídos a partir dos resultados de MLVA, PFGE e ERIC-PCR (SERIBELLI et al., 2016). Os dendrogramas apresentaram dois *clusters* e isolados representativos destes dois grupos foram selecionados de acordo com a presença genes de virulência e com o perfil de resistência.

O MLST foi realizado sequenciando-se sete genes *housekeeping* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*). Os *primers* para amplificação dos sete genes *housekeeping* e a temperatura de hibridação foram os disponibilizados no banco de dados de MLST para *E. coli* (MLST Databases at Uow Warwick Medical School: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>) (Tabela 10).

Tabela 10 - *Primers* utilizados para a metodologia de MLST na tipagem de *Shigella sonnei*

Genes	Sequências dos <i>primers</i> (5'- 3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura (°C)
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	54
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806	54
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	911	60
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACCTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932	60
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816	54
<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC TCGTGCAAATCTACGGACCGGA	780	58

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 50µl, como descrito por Souza et al. (2010). A Tabela 11 traz de forma detalhada os reagentes e as concentrações utilizadas nas reações de amplificação.

Tabela 11 - Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR

Componentes	Volume (µL)
10X High Fidelity PCR Buffer^a	5
50 mM MgSO₄^a	2
200 µM dNTP^a	1
<i>primers</i> F	2,5
<i>primers</i> R	2,5
Taq DNA Polimerase High Fidelity^a	1
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase^a	q.s.p.-50
DNA	5

^a Produto Invitrogen

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, posteriormente corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos, observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

Os *amplicons* foram purificados utilizando o Kit PureLink™ Quick PCR Purification (Life Technologies), para posteriormente, serem sequenciados.

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, situado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em sequenciador automático de DNA ABI 3500xL *Genetic Analyzer Sequencer* (Applied Biosystems – Life Technologies).

Ressalta-se que para cada uma das 20 linhagens tipadas por MLST, foram sequenciados os sete genes *housekeeping* e foram realizadas duas reações com cada um dos *primers forward* e duas reações com cada um dos *primers reverse*. Dessa forma, para cada um dos sete genes foram feitas quatro reações de amplificação para cada uma das 20 linhagens, o que totalizou 560 reações de sequenciamento.

4.9.1. Análise dos dados de MLST (genes *housekeeping*)

Cada conjunto de sequências de um mesmo gene e de uma mesma linhagem foi analisado individualmente, pelo programa *ChromasPro* versão 1.41 (Technelysium Pty LTD). Pela análise dos eletroferogramas foram gerados *contigs*, ou seja, sequências

sobrepostas do gene em questão, a fim de obter-se a sequência consenso para cada gene de cada linhagem sequenciada. Foram utilizadas sequências padrões dos genes *housekeeping*, disponíveis no banco de dados de *S. sonnei*.

4.9.2. Construção do diagrama de similaridade genética

O programa *eBURSTv3* (<http://eburst.mlst.net/>) foi utilizado para a construção do diagrama de similaridade genética das linhagens do presente estudo e das linhagens disponíveis no banco de dados de *Escherichia coli*, afim de demonstrar as relações filogenéticas entre as mesmas.

4.10. Cálculo do índice de discriminação

Para o cálculo do índice de discriminação das metodologias de tipagem utilizadas no presente trabalho, foi utilizada uma variação do índice de diversidade de Simpson (Simpson, 1949). O índice de discriminação (D) utilizado (Hunter e 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:

$$D = 1 - [1 / N(N - 1)] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

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

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de *S. sonnei*

As 72 linhagens bacterianas listadas na Tabela 1 foram reativadas e reconfirmadas como *S. sonnei*.

5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

Todas as linhagens de *S. sonnei* estudadas apresentaram pureza entre 1,90 e 2,10 e foram consideradas satisfatórias para a utilização na pesquisa dos genes de virulência por PCR, ERIC-PCR, MLVA e MLST. A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese para a avaliação da integridade do DNA genômico de algumas das linhagens de *S. sonnei* estudadas.

Figura 1 - Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% de algumas linhagens de *Shigella sonnei* estudadas. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18, linhagens de *S. sonnei*: Sn 07 (1), Sn 10 (2), Sn 11 (3), Sn 12 (4), Sn 15 (5), Sn 18 (6), Sn 19 (7), Sn 20 (8), Sn 21 (9), Sn 23 (10), Sn 25 (11), Sn 27 (12), Sn 28 (13), Sn 30 (14), Sn 31 (15), Sn 32 (16), Sn 33 (17) e Sn 34 (18).

5.3. Genes de virulência por PCR

Foram pesquisados 12 genes de virulência para as 72 linhagens de *S. sonnei* listadas na Tabela 2. A Tabela 12 mostra de forma detalhada a frequência dos genes pesquisados. Todas as 72 linhagens apresentaram os genes *ipaH*, *iuc* e *sigA*. O gene *ipaBCD* foi encontrado em 14 (19%) linhagens, os genes *ial* e *virF* foram encontrados em 13 (18%) linhagens e o gene *sen*

foi encontrado em sete (10%) linhagens. Os genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sepA* e *sat* não foram detectados em nenhuma linhagem.

Tabela 12 – Frequência dos genes de virulência pesquisados para as 72 linhagens de *Shigella sonnei*

Genes de Virulência	Total (%) n=72
<i>ipaH</i>	72 (100)
<i>iuc</i>	72 (100)
<i>sigA</i>	72 (100)
<i>ipaBCD</i>	14 (19)
<i>ial</i>	13 (18)
<i>virF</i>	13 (18)
<i>sen</i>	07 (10)

OBS: Os genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sepA* e *sat* não foram detectados.

5.4. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Das 72 linhagens de *S. sonnei* estudadas, 27 (37,5%) linhagens foram sensíveis a todos os 16 antimicrobianos testados. Quarenta e cinco (62,5%) linhagens de *S. sonnei* foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado. A resistência mais encontrada foi à sulfametoxazol-trimetoprim, sendo que 42 (58,3%) linhagens de *S. sonnei* demonstraram essa resistência. Trinta (41,6%) linhagens foram resistentes à tetraciclina. Onze (15,5%) linhagens foram resistentes à ampicilina e piperacilina. Três (4,2%) linhagens foram resistentes à cefotaxima. Três (4,2%) linhagens foram resistentes ao cloranfenicol. Duas (2,8%) linhagens foram resistentes à ampicilina-sulbactam. Duas (2,8%) linhagens foram resistentes ao ácido nalidíxico. Uma (1,4%) linhagem foi resistente à amoxicilina-ácido clavulânico. Todas as linhagens foram sensíveis à gentamicina, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, ceftazidima e ofloxacina (Tabela 13).

Tabela 13 – Perfil de resistência frente aos 16 antimicrobianos testados nas linhagens de *Shigella sonnei* estudadas

Antimicrobianos	Nº linhagens resistentes (%)	Antimicrobianos	Nº linhagens resistentes (%)
Sulfametoxazol-trimetoprim	42 (58,3)	Amoxicilina-ácido clavulânico	1 (1,4)
Tetraciclina	30 (41,6)	Gentamicina	0
Ampicilina	11 (15,5)	Cefepime	0
Piperacilina	11 (15,5)	Ciprofloxacina	0
Cefotaxima	3 (4,2)	Levofloxacina	0
Cloranfenicol	3 (4,2)	Imipenem	0
Ampicilina-sulbactam	2 (2,8)	Ceftazidima	0
Ácido nalidíxico	2 (2,8)	Ofloxacina	0

O perfil de resistência mais evidenciado foi TE-SXT, sendo que 27 (37,5%) linhagens de *S. sonnei* demonstraram esse perfil. Cinco (7%) linhagens de *S. sonnei* foram MDR (Tabela 14).

Tabela 14 – Perfil de resistência das 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas

Perfil de Resistência	Total (%) n=72	Número de Multidroga Resistente (%)
PRL-AMC-AMP-TE-SXT-SAM	1 (1,4)	1 (1,4)
PRL-AMP-SXT-SAM	1 (1,4)	0
CTX-PRL-AMP-SXT	3 (4,2)	3 (4,2)
PRL-AMP-SXT	6 (8,3)	0
TE-SXT-C	1 (1,4)	1 (1,4)
TE-SXT	27 (37,5)	0
TE-C	1 (1,4)	0
SXT-NA	1 (1,4)	0
SXT	2 (2,8)	0
NA	1 (1,4)	0
C	1 (1,4)	0
Nº total de linhagens resistentes	45 (62,5)	5 (7)

AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

OBS: 27 linhagens foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Não foi encontrada resistência à: gentamicina, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, ceftazidima e ofloxacina.

Multidroga resistente: resistência a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes.

5.5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A Figura 2 traz um gel representativo de algumas das linhagens de *S. sonnei* estudadas após uma eletroforese em campo pulsado.

Figura 2 – Gel representativo de agarose 1,0% do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Shigella sonnei* estudadas após digestão com a enzima *XbaI*. M: Marcador de peso molecular *Salmonella* ser. Braenderup H9812 digerido com *XbaI*. Canaletas 1 a 12, linhagens representativas de *S. sonnei*: Sn 08 (1), Sn 09 (2), Sn 13 (3), Sn 14 (4), Sn 16 (5), Sn 17 (6), Sn 19 (7), Sn 20 (8), Sn 21 (9), Sn 22 (10), Sn 23 (11) e Sn 24 (12).

As 72 linhagens foram alocadas em dois grupos, denominados PFGE-A e PFGE-B (Figura 3). No grupo PFGE-A foram agrupadas 39 linhagens isoladas nos anos de 1983 a 2014 com uma similaridade $\geq 73,6\%$ entre si, destas 35 apresentaram uma similaridade $\geq 80,3\%$. No grupo PFGE-B foram agrupadas 33 linhagens isoladas nos anos de 1984 a 2014 com uma similaridade $\geq 74,7\%$ entre si, destas 27 apresentaram uma similaridade $\geq 83,0\%$. Entre os grupos PFGE-A e PFGE-B a similaridade foi de 70,8%. O método PFGE diferenciou as linhagens em 63 PFGE-tipos (Figura 3).

Figura 3 – Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de PFGE com a enzima *XbaI* para as 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas. CE = caso esporádico; S = surto. AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

5.6. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR)

A Figura 4 traz um gel representativo dos produtos de PCR gerados pelo ensaio de ERIC-PCR para algumas das linhagens de *S. sonnei* estudadas.

Figura 4 – Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5% M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 16, linhagens representativas de *Shigella sonnei*: Sn 09 (1,2), Sn 10 (3,4), Sn 11 (5,6), Sn 12 (7,8), Sn 13 (9,10), Sn 14 (11,12), Sn 15 (13,14) e Sn16 (15,16).

As 72 linhagens foram alocadas em dois grupos, denominados ERIC-A e ERIC-B (Figura 5). No grupo ERIC-A foram agrupadas 37 linhagens isoladas de 1983 a 2014 com uma similaridade $\geq 78,8\%$ entre si, destas 36 exibiram uma similaridade $\geq 82,3\%$. No grupo ERIC-B foram agrupadas 34 linhagens isoladas de 1987 a 2014 com uma similaridade $\geq 84,0\%$ entre si. A linhagem Sn 25 não ficou agrupada em nenhum dos grupos principais. Entre os grupos ERIC-A e ERIC-B a similaridade foi de 76,8%. O método ERIC-PCR diferenciou as linhagens em 32 ERIC-tipos (Figura 5).

Figura 5 – Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de ERIC-PCR para as 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas. CE = caso esporádico; S = surto. AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

5.7. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

O dendrograma de similaridade genotípica gerado pela técnica de MLVA agrupou as 72 linhagens de *S. sonnei* em dois grupos denominados MLVA-A e MLVA-B (Figura 6). No grupo MLVA-A foram agrupadas 31 linhagens isoladas nos anos de 1983 a 2014 com uma similaridade $\geq 40\%$ entre si. No grupo MLVA-B foram agrupadas 41 linhagens isoladas nos anos de 1983 a 2014 com uma similaridade $\geq 21,6\%$ entre si. Entre os grupos MLVA-A e MLVA-B a similaridade foi de 6,6%. O método MLVA diferenciou as linhagens em 64 MLVA-tipos (Figura 6).

Figura 6 – Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA para as 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas. CE = caso esporádico; S = surto. AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

5.8. Similaridade genotípica, genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos

A Tabela 15 mostra de forma detalhada a frequência dos genes de virulência pesquisados, assim como, o número de linhagens positivas para esses genes nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B. A linhagem Sn 25 não foi alocada em nenhum dos grupos principais pelo método de ERIC-PCR, porém a sua frequência dos genes de virulência é mostrado no total das linhagens.

O perfil de resistência a antimicrobianos está detalhado na Tabela 16, sendo que esta também demonstra os resultados do perfil de resistência das linhagens alocadas nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B. A linhagem Sn 25 não foi alocada em nenhum dos grupos principais pelo método de ERIC-PCR, porém seu perfil de resistência é mostrado no total das linhagens.

Tabela 15 – Frequência dos genes de virulência pesquisados nas 72 linhagens de *Shigella sonnei* estudadas e o número de linhagens positivas nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B

Genes	Total (%)	Número de linhagens positivas (%)		Número de linhagens positivas (%)		Número de linhagens positivas (%)		p-value ¹
		PFGE-A n=39	PFGE-B n=33	ERIC-A n=37	ERIC-B n=34	MLVA-A n=31	MLVA-B n=41	
<i>ipaH</i>	*72 (100)	39 (100)	33 (100)	37 (100)	35 (100)	31 (100)	41 (100)	NA
<i>iuc</i>	*72 (100)	39 (100)	33 (100)	37 (100)	35 (100)	31 (100)	41 (100)	NA
<i>sigA</i>	*72 (100)	39 (100)	33 (100)	37 (100)	35 (100)	31 (100)	41 (100)	NA
<i>ipaBCD</i>	14 (19)	4 (10)	10 (30)	4 (11)	10 (28)	3 (10)	11 (27)	NS
<i>ial</i>	13 (18)	4 (10)	9 (27)	4 (11)	9 (26)	3 (10)	10 (27)	NS
<i>virF</i>	13 (18)	4 (10)	9 (27)	4 (11)	9 (26)	3 (10)	10 (27)	NS
<i>sen</i>	07 (10)	4 (10)	3 (9)	4 (11)	3 (8)	3 (10)	4 (10)	NS

Os genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sepA* e *sat* não foram detectados.

NA = não aplicável; NS = não significativo.

¹p<0,05 é significativo, calculado pelo teste exato de Fisher.

*Sn 25: a linhagem Sn 25 não foi alocada em nenhum dos grupos ERIC-A e ERIC-B, mas a frequência dos genes de virulência é apresentado no total.

Tabela 16 – Perfil de resistência das 72 linhagens de *Shigella sonnei* e o número de linhagens resistentes nos grupos PFGE-A, PFGE-B, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A e MLVA-B

Perfil de Resistência	Total (%)	Número de linhagens positivas (%)		Número de linhagens positivas (%)		Número de linhagens positivas (%)		p-value ¹
		PFGE-A n=39	PFGE-B n=33	ERIC-A n=37	ERIC-B n=34	MLVA-A n=31	MLVA-B n=41	
PRL-AMC-AMP-TE-SXT-SAM	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
PRL-AMP-SXT-SAM	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
CTX-PRL-AMP-SXT	3 (4,2)	0	3	0	3	0	3	NA
PRL-AMP-SXT	*6 (8,3)	6	0	5	0	5	1	NA
TE-SXT-C	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
TE-SXT	27 (37,5)	3	24	1	26	1	26	<0,05
TE-C	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
SXT-NA	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
SXT	2 (2,8)	0	2	0	2	0	2	NA
NA	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
C	1 (1,4)	1	0	1	0	1	0	NA
Número total de linhagens resistentes	45 (62,5)	16 (41)	29 (88)	13 (35)	31 (91)	13 (42)	32 (78)	NA

AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

OBS: 27 linhagens foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Não foi encontrada resistência à: gentamicina, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, ceftazidima e ofloxacina.

NA = não aplicável.

¹p<0,05 é significativo, calculado pelo teste exato de Fisher.

*Sn 25: a linhagem Sn 25 não foi alocada em nenhum dos grupos ERIC-A e ERIC-B, mas o seu perfil de resistência é apresentado no total.

5.9. Multi-locus sequence typing (MLST)

5.9.1. Amplificação de genes *housekeeping*

Os sete genes *housekeeping* propostos no banco de dados de MLST para *E. coli* foram amplificados nas 20 linhagens de *S. sonnei* sublinhadas e destacadas com um * na Tabela 2. Após a análise de corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% foi possível à observação dos fragmentos amplificados obtidos para cada gene, confirmando assim os seus respectivos tamanhos (Tabela 10).

5.9.2. Sequenciamento

Todas as sequências obtidas no presente estudo, referentes aos sete genes *housekeeping* para as 20 linhagens de *S. sonnei* selecionadas foram consideradas satisfatórias para análise.

Após o alinhamento das duas sequências *forward* e duas sequências *reverse* para cada um dos sete genes de cada linhagem estudada, uma sequência consenso individual de cada linhagem foi obtida. A Figura 7 é representativa e ilustra esse alinhamento das sequências *forward* e das sequências *reverse* da linhagem de *S. sonnei* (Sn 01) e a sequência de referência do gene *adh* encontrada no banco de dados também é demonstrada.

Figura 7 – Alinhamento e análise de sequências do gene *adh* de *Shigella sonnei* pelo programa *ChromasPro*.

5.9.3. Diagramas de similaridade genética gerado com os dados do MLST

Todas as 20 linhagens selecionadas para o MLST apresentaram os seguintes alelos: 11 (*adh*), 63 (*fumC*), 7 (*gyrB*), 1 (*icd*), 14 (*mdh*), 7 (*purA*) e 7 (*recA*). A ordem desses alelos gerou o ST152. Não foi observada correlação entre o ST, frequência dos genes de virulência e o perfil de resistência entre as linhagens de *S. sonnei* estudadas (Apêndice II).

A Figura 8 traz o diagrama gerado a partir das 8166 linhagens de *E.coli* e *Shigella* spp. disponíveis no banco de dados até 19/09/2016 com as 20 linhagens de *S. sonnei* do presente estudo tipadas por MLST.

Figura 8 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de todas as 8166 linhagens de *E.coli* e *Shigella* spp. disponíveis no banco de dados até 19/09/2016 e com as 20 linhagens de *Shigella sonnei* pertencentes ao ST152 (círculo rosa). Em azul estão os grupos *founders* (central de complexos clonais), em amarelo os subgrupos *founders* e em preto todos os outros STs do banco de dados. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens.

A Figura 9 traz o diagrama gerado com as 20 linhagens de *S. sonnei* e outras linhagens do banco de dados relacionadas. O ST 152 destacado em rosa apresentou 15 *single locus variant* (SLV) (STs 151, 241, 1272, 1502, 1503, 1504, 1505, 1754, 1755, 1756, 1757, 2395, 2406, 2411 e 2421) e apresentou quatro *double locus variant* (DLV) (STs 2391, 2400, 2424 e 2429).

Existem quatro linhagens depositadas no banco de dados como ST152 até 19/09/2016. Duas linhagens de *S. sonnei* isoladas de fezes diarreicas de humanos em 1997 na Alemanha e em 2009 na China. Uma linhagem de *S. flexneri* isolada de fezes diarreicas de humano em 2010 na China. E por fim, uma linhagem de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) isolada de fezes diarreicas de humano em 2012 no Reino Unido (Apêndice III).

Os principais SLV são *S. sonnei* isoladas em diferentes países, como por exemplo, Alemanha, Gâmbia, Vietnã e República Dominicana. Dois SLV são de *S. flexneri* isoladas na Gâmbia (Apêndice IV). Os quatro DLV são todos do gênero *Shigella*, sendo três *S. flexneri* sorotipos 2a e 1b e uma *S. boydii* isoladas na Gâmbia (Apêndice V).

Até o momento, além das linhagens do presente estudo nenhuma linhagem de *Shigella sonnei* isolada no Brasil havia sido depositada no banco de dados.

Figura 9 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com as 20 linhagens de *Shigella sonnei* selecionadas desse estudo e linhagens relacionadas depositadas no banco de dados até 19/09/2016. Todas as linhagens foram tipadas como ST152. Em azul estão os grupos *founders* (central de complexos clonais), em amarelo os subgrupos *founders* e em preto todos os outros STs do banco de dados. Escrito em rosa está o ST encontrado no presente estudo. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens.

6. Índice de Discriminação

O índice de discriminação foi de 0,995 para PFGE, 0,965 para ERIC-PCR e de 0,996 para MLVA.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As infecções causadas por *Shigella* spp. ocorrem em vários países do mundo, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade em países em desenvolvimento. *Shigella* spp. podem causar uma diarreia aguda severa resultando em taxas de mortalidade menores apenas que os rotavírus, dentre os patógenos causadores de diarreia (COLLABORATORS e GBD, 2015). Assim sendo, estudos que determinem o potencial patogênico, perfil de resistência e diversidade genotípica dessa bactéria são particularmente de grande importância em países em desenvolvimento (PENATTI et al., 2007; FARSHAD; RANJBAR e HOSSEINI, 2015).

No presente estudo, todas as 72 linhagens de *S. sonnei* isoladas no Estado de São Paulo apresentaram os genes de virulência *ipaH*, *iuc* e *sigA*. Os genes plasmidiais *ipaBCD* foram encontrados em 14 (20%) linhagens, o gene *ial* em 13 (18%) linhagens, o gene *virF* em 13 (18%) linhagens e o gene *sen* em sete (10%) linhagens de *S. sonnei*. Os genes *set1A*, *set1B*, *pic*, *sepA* e *sat* não foram detectados em nenhuma das 72 linhagens de *S. sonnei* estudadas (Tabela 4) (SERIBELLI et al., 2016).

No Brasil alguns trabalhos foram realizados, de acordo com Sousa et al. (2013), dentre os genes *ial*, *ipaH*, *iuc*, *sat*, *sen* e *set1A* pesquisados em 17 isolados de *Shigella* spp. de um hospital para crianças em Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a março de 2005, o genótipo de marcadores de virulência encontrado em todas as 15 linhagens de *S. sonnei* e 2 linhagens de *S. flexneri* estudadas foi *ipaH*⁺ *iuc*⁺, assim como o do presente estudo, onde todas as 72 linhagens de *S. sonnei* estudadas foram positivas para tais genes.

O gene *ipaH* foi encontrado em todos os 24 isolados de *Shigella* spp. do Hospital Infantil Público Cosme Damião de março de 2000 a março de 2002, em Porto Velho, Estado de Rondônia, diferentemente do presente estudo o gene *ipaBCD* também foi pesquisado e encontrado em todos os isolados estudados (SILVA et al., 2008).

Por outro lado, em Manaus, região Amazônica, Cruz et al. (2014), isolaram 30 linhagens de *Shigella* spp. em três hospitais da cidade no período de agosto de 2007 a dezembro de 2008, e pesquisaram nove genes de virulência nessas linhagens. O gene *ipaBCD* foi encontrado em todos os isolados, enquanto que o gene *ipaH* foi encontrado em 63,3% das linhagens estudadas. Contudo, esses pesquisadores procuraram especificamente apenas a cópia *ipaH* 7.8 que é um gene plasmidial que desempenha um papel na modulação da resposta

inflamatória de *Shigella* spp. Os genes *sen*, *ial* e *virF* foram encontrados em 43,3%, 56,7% e 43,3%, respectivamente, frequências mais altas em comparação com o presente estudo.

Em outros locais do mundo, o gene *ipaBCD* também foi pesquisado por Sharma e colaboradores (2009) na Índia, sendo que 10 linhagens de *S. sonnei* foram estudadas, e nenhuma delas apresentou este gene de virulência. Mokhtari et al. (2012), pesquisaram na Tunísia quatro genes de virulência em 22 linhagens de *Shigella* spp., sendo seis isoladas de alimentos e 16 de fezes diarreicas de humanos, o gene *ipaH* foi encontrado em 100% das linhagens, os genes *ial*, *ipaBCD*, *sen* e *set* foram encontrados em 59%, 54%, 59% e 9%, respectivamente, frequências mais altas em comparação com o presente estudo.

Binet e colaboradores (2014), estudaram 57 linhagens de *S. sonnei* nos Estados Unidos e todas as linhagens apresentaram o gene *ipaH*.

De acordo com Kingombe e colaboradores (2005), no Canadá todas as 56 linhagens de *Shigella* spp. estudadas foram positivas para os genes *ipaH* e *iuc*, diferentemente do padrão encontrado em EIEC, onde apenas 33% das 15 linhagens tiveram os genes *ipaH* e *iuc* positivos. O gene *ial* também foi pesquisado para essas linhagens de *Shigella* spp., sendo que 38% foram positivas para esse gene.

Dejli et al. (2013), estudaram 99 linhagens de *S. sonnei* isoladas de 1999 a 2005 no Egito e pesquisaram os genes *ipaH*, *sen* e *set*. O gene *ipaH* estava presente em todos os isolados, o gene *sen* em 82,2% dos isolados, frequência bem mais alta em comparação com o presente estudo e similarmente aos nossos resultados o gene *set* não foi detectado em nenhuma linhagem estudada.

Trinta e sete linhagens de *Shigella* spp. foram isoladas em um hospital em Gabão, África no período de julho de 2011 a março de 2013, sendo que todas as linhagens apresentaram os genes de virulência *ial* e *ipaH*. Os genes *set1A* e *set1B* também foram pesquisados e encontrados apenas em isolados de *S. flexneri* (SCHAUMBURG et al., 2015).

Thong et al. (2005), isolaram 15 linhagens de *S. sonnei* de 1997 a 2000 na Malásia e pesquisaram os genes de virulência *ipaH*, *ial*, *set1A* e *set1B*. O gene *ipaH* foi encontrado em 100% das linhagens, o gene *ial* em 13% das linhagens e os genes *set1A* e *set1B* não foram detectados em nenhuma linhagem, frequências similares quando comparadas com o presente estudo.

Boisen e colaboradores (2009), mostraram a alta prevalência das toxinas autotransportadoras serina protease (SPATEs) de classe I, codificadas pelo gene de virulência *sigA* em 12 isolados de *Shigella* spp. na Dinamarca. A linhagem de *S. sonnei* utilizada por

esses autores foi isolada no Chile e apresentou o mesmo genótipo *sat*⁻, *sigA*⁺, *pic*⁻ e *sepA*⁻ de SPATEs de classe I e de classe II das linhagens do presente estudo (SERIBELLI et al., 2016).

A alta frequência do gene *ipaH* no presente estudo e nos demais acima citados, pode ser explicada pelo alto número de cópias desse gene no cromossomo e em plasmídeos de virulência de *Shigella* spp. (CRUZ et al., 2014; FARSHAD; RANJBAR e HOSSEINI, 2015). Assim como, a presença do gene *iuc* relacionado à síntese e transporte de aerobactina que também é encontrado no cromossomo de *Shigella* spp. em uma ilha de patogenicidade (LAWLOR e PAYNE, 1984; KINGOMBE et al., 2005). Ademais, o gene *sigA* também é encontrado em uma ilha de patogenicidade no cromossomo de *Shigella* spp., relacionado com a secreção de íons e acumulação de fluidos intestinais, descrito primeiramente em *S. flexneri* (AL-HASANI et al., 2000; BOISEN et al., 2009).

Os genes plasmidiais *ipaBCD*, *ial*, *virF* e *sen* foram encontrados no presente estudo e nos demais acima citados em quantidades variáveis, sendo que a regulação gênica do plasmídeo de virulência de *Shigella* spp. é induzida a 37°C e reprimida a 30°C (SCHUCH e MAURELLI, 1997). As linhagens do presente estudo são provenientes de uma coleção de bactérias que eram mantidas em temperatura ambiente em meio de cultura sólido, assim sendo essa instabilidade no ambiente de armazenamento poderiam ter propiciado mutações e diferenças nas populações estudadas, bem como, perda de plasmídeos de virulência.

Portanto, pode-se dizer que a presença de importantes genes de virulência, tais como *ipaH*, *iuc* e *sigA* encontrados em todas as linhagens e de outros genes relacionados à invasão e à produção de enterotoxinas em algumas linhagens evidencia o possível potencial patogênico das linhagens de *S. sonnei* estudadas no presente trabalho.

Altas taxas de resistência de *Shigella* spp. a antimicrobianos têm sido reportadas em várias partes do mundo (BASTOS e LOUREIRO, 2011; NUNES et al., 2012; GONZÁLEZ-TORRALBA; GARCÍA-ESTEBAN e ALÓS, 2015).

Das 72 linhagens de *S. sonnei* estudadas, 27 (37,5%) linhagens foram sensíveis a todos os 16 antimicrobianos testados. Quarenta e cinco (62,5%) linhagens de *S. sonnei* foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado (Tabela 14). Vale destacar as altas taxas de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (58,3%) e à tetraciclina (41,6%) nas linhagens de *S. sonnei* estudadas (SERIBELLI et al., 2016). Um total de 11 (15,3%) linhagens de *S. sonnei* mostraram um perfil de resistência a classe de antimicrobianos β -lactâmicos (Tabela 14).

A alta porcentagem de resistência a alguns dos antimicrobianos testados é preocupante e pode levar à falha terapêutica. Especificamente, as altas taxas de resistência à

sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina são alarmantes uma vez que estes antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento da shigelose (CDC, 2015).

No Brasil, Bastos e Loureiro (2011), isolaram 40 linhagens de *S. sonnei* no Departamento de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas no Estado do Pará. Dessas linhagens, 95% foram resistentes à tetraciclina, 62,5% resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim, 42,5% resistentes ao cloranfenicol e 17,5% resistentes à ampicilina. Portanto, apresentaram taxas de resistência a tetraciclina e ao cloranfenicol maiores que a do presente estudo, bem como, taxas de resistência a sulfametoxazol-trimetoprim e a ampicilina próximas aos nossos resultados.

Penatti et al. (2007), estudaram 30 linhagens de *S. sonnei* isoladas na área metropolitana de Campinas, no Estado de São Paulo, no período de 1997 a 2002 e todas as linhagens foram resistentes à sulfametoxazol, 96,7% foram resistentes à tetraciclina e 6,7% foram resistentes à ampicilina. Assim sendo, as taxas de resistência a sulfametoxazol e tetraciclina foram maiores que a do presente estudo, tal como, as taxas de resistência a ampicilina foram menores do que os nossos resultados.

Também no Brasil, Diniz-Santos et al. (2005), pesquisaram 141 linhagens de *Shigella* spp. isoladas em Salvador, Bahia no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003, sendo que 90,1% foram resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim, 22% resistente à ampicilina e 8,5% resistente à piperacilina. Dessa maneira, as taxas de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim e ampicilina foram maiores que a do presente estudo, do mesmo modo que, as taxas de resistência a piperacilina foram menores do que os nossos resultados.

De acordo com o CDC (2013), nos Estados Unidos ocorrem 27.000 infecções por *Shigella* spp. multidroga resistentes todos os anos. A resistência de *Shigella* spp. à sulfametoxazol-trimetoprim tem aumentado nos últimos anos nos Estados Unidos, onde a porcentagem de resistência está na faixa de 60% a 70%, ou seja, próximo do encontrado no presente estudo.

Zhang e colaboradores (2014), estudaram 1.635 amostras de *Shigella* spp. isoladas no período de 2004 a 2011 em Shangai na China. Destas 86,9% foram resistentes à tetraciclina e 80,1% foram resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim, entre outros antimicrobianos. Em Ancara, na Turquia 238 linhagens de *Shigella* spp. foram isoladas entre os anos de 2003 a 2009, sendo que 71,6% dessas linhagens foram resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim, 31,4% resistentes à ampicilina e 3,5% resistentes ao ácido nalidíxico (OZMERT et al., 2011). Portanto, as taxas de resistência nos trabalhos acima citados a sulfametoxazol-trimetoprim,

tetraciclina e ampicilina foram maiores que a do presente estudo, assim como, as taxas de resistência ao ácido nalidíxico foram similares aos nossos resultados.

É interessante mencionar que as linhagens do presente estudo são provenientes de uma extensa (1983-2014) coleção de bactérias que eram mantidas em temperatura ambiente em meio de cultura sólido, assim sendo essa instabilidade no ambiente de armazenamento poderiam ter propiciado mutações e diferenças nas populações estudadas, bem como, perda de plasmídeos de resistência.

As beta lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas que degradam o anel β -lactâmico, portanto são responsáveis pela resistência de linhagens bacterianas à classe de antimicrobianos β -lactâmicos (PATERSON e BONOMO, 2005). Com o passar do tempo, as ESBLs estão se tornando muito complexas e diversificadas, gerando assim desafios para pesquisadores que criam padrões de detecção dessas enzimas na área da microbiologia clínica (PATERSON e BONOMO, 2005).

Ranjbar e colaboradores (2013), estudaram 55 linhagens de *Shigella* spp. isoladas no Centro Médico de Crianças no Irã entre os anos de 2008 a 2010. Um total de quatro linhagens mostraram um fenótipo positivo de resistência aos β -lactâmicos, sendo que três linhagens eram de *S. sonnei* e uma de *S. flexneri*. Na Turquia a presença de resistência aos β -lactâmicos também foi evidenciada, um total de 43 linhagens de *S. sonnei* isoladas no Hospital Universitário de Ancara entre os anos de 2004 a 2006 foram estudadas, pelo método de disco difusão resistências as penicilinas e cefalosporinas de terceira geração foram observadas em cinco linhagens (KACMAZ et al., 2014).

Segundo Peirano e colaboradores (2005), 62 linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri* foram estudadas, isoladas entre os anos de 1999 a 2003 no Brasil. Dessas, 49 foram resistentes à ampicilina, 30 foram resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico e uma linhagem resistente à cefalotina. Embora, as taxas de resistência aos β -lactâmicos do presente estudo não tenham sido altas em qualquer frequência essa resistência é preocupante.

No Brasil e no mundo, as altas taxas de resistência de *Shigella* spp. diante dos antimicrobianos são alarmantes e também evidenciadas no presente estudo, assim como nos demais trabalhos acima citados. Além disso, devemos destacar que muitos desses antimicrobianos como o sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e ampicilina, entre outros, podem ser utilizados na terapia da shigelose quando necessária (BASTOS e LOUREIRO, 2011; CDC, 2013; CDC, 2015).

A metodologia de PFGE é considerada o padrão ouro de tipagem molecular para muitas bactérias, sendo que este é um método com alto poder discriminatório e reprodutibilidade (RIBOT et al., 2006).

O dendrograma de similaridade genético gerado a partir do PFGE alocou as 72 linhagens de *S. sonnei* em dois grandes grupos. O grupo PFGE-A agrupou 35 linhagens que apresentaram uma similaridade $\geq 80,3\%$ e no grupo PFGE-B 27 linhagens apresentaram uma similaridade $\geq 83,0\%$ (Figura 3). Assim sendo, estes dados sugerem que existam dois subtipos prevalentes nas *S. sonnei* estudadas que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, Brasil (SERIBELLI et al., 2016).

As similaridades $\geq 70\%$ pelo PFGE entre as linhagens de *S. sonnei* foram evidenciadas por outros autores de Taiwan, Bangladesh, Butão, Irã e Argentina (LEE et al., 2003; UD-DIN et al., 2013; RUEKIT et al., 2014; FARSHAD; RANJBAR e HOSSEINI, 2015). Estes dados corroboram com o do presente estudo, onde as linhagens dos grupos PFGE-A e PFGE-B tiveram uma similaridade $\geq 70,9\%$ entre si (Figura 3). A alta similaridade genética entre as linhagens de *S. sonnei* pela técnica de PFGE também foi evidenciada por Cheng et al. (2014), o qual foi realizado na China com 50 linhagens de *S. sonnei* e a similaridade encontrada entre os 10 grupos foi de 83%.

Em contraste, um estudo realizado por Angelini et al. (2009), utilizou a técnica de PFGE para tipar 119 linhagens de *S. sonnei* e *S. flexneri* da região metropolitana de Campinas e de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo isoladas no período de 1987 a 2001. No referido trabalho, uma alta diversidade $\geq 35\%$ entre as linhagens de *Shigella* spp. foi encontrada.

Comparando as linhagens dos grupos PFGE-A e PFGE-B, as pertencentes ao grupo PFGE-B apresentaram uma maior frequência de genes de virulência (Tabela 7 e Figura 3). Todas as 72 linhagens apresentaram os genes *ipaH*, *iuc* e *sigA*. Especificamente, 11 (33%) das 33 linhagens do grupo PFGE-B apresentaram além dos genes *ipaH*, *iuc* e *sigA* de um a quatro genes a mais, tais como, os genes *ipaBCD*, *ial* e *virF*. Já no grupo PFGE-A apenas quatro (10%) das 39 linhagens apresentaram esse perfil (Tabela 15 e Figura 3).

É interessante mencionar que 16 linhagens (41%) das 39 linhagens do grupo PFGE-A foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e dessas duas foram MDR, isto é, resistente a três ou mais classes de antibióticos (Tabela 16 e Figura 3). Do grupo PFGE-B, 29 linhagens (88%) das 33 linhagens foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e três linhagens MDR que foram indistinguíveis entre si (Tabela 16 e Figura 3). Interessantemente o grupo PFGE-A agrupou oito das 11 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre

os anos de 1988 e 2004 que mostraram um perfil de resistência à classe de antimicrobianos β -lactâmicos, mas linhagens do grupo PFGE-B apresentaram taxas de resistência muito maiores a sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina em comparação com as linhagens do grupo PFGE-A (Figura 3).

Os resultados de PFGE, presença de genes de virulência e perfil de resistência sugerem em conjunto que o subtipo representado pelas linhagens do grupo PFGE-B com similaridade acima de 83,0% possam ter um possível maior potencial patogênico do que o subtipo representado pelas linhagens do grupo PFGE-A com similaridade acima de 80,3%, devido a maior frequência dos genes de virulência pesquisados (Tabela 15 e Figura 3), bem como, mostram uma maior resistência a antimicrobianos nas linhagens desse grupo B (Tabela 16 e Figura 3) (SERIBELLI et al., 2016).

Um dado interessante são os resultados obtidos no dendrograma de similaridade genética gerado pela técnica de ERIC-PCR para as 72 linhagens de *S. sonnei*. Nesse dendrograma, as linhagens se alocaram de forma muito semelhante aos do PFGE, sendo que apenas quatro linhagens (Sn 04, Sn 25, Sn 44 e Sn 48) se agruparam em grupos diferentes. Os surtos 1, 5 e 7 permaneceram no grupo A (ERIC-A e PFGE-A) e os surtos 2, 3, 4 e 6 no grupo B (ERIC-B e PFGE-B) (Figura 3 e Figura 5). No grupo ERIC-A foram agrupadas 36 linhagens isoladas de 1983 a 2014 com uma similaridade $\geq 82,3\%$ entre si. No grupo ERIC-B foram agrupadas 34 linhagens isoladas de 1987 a 2014 com uma similaridade $\geq 84,0\%$ entre si (Figura 5). Sugerindo, que existam dois subtipos prevalentes nas *S. sonnei* estudadas que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo (SERIBELLI et al., 2016).

No Brasil, Penatti e colaboradores (2007), realizaram a tipagem por ERIC-PCR de 30 linhagens de *S. sonnei* isoladas no período de 1997 a 2002, no Estado de São Paulo, sendo que foi observada uma similaridade $\geq 77\%$ entre as linhagens estudadas.

Um estudo realizado por Kosek et al. (2012), enfatizou a importância de se tipar linhagens de *S. sonnei* por ERIC-PCR, pois esta técnica é rápida, de baixo custo e pode ter um papel complementar nos dados obtidos por PFGE. Tais pesquisadores tiparam por ERIC-PCR 116 linhagens de *Shigella* spp. no Peru e uma alta diversidade $\geq 40\%$ entre as linhagens foi observada.

Também ao compararmos novamente as linhagens dos grupos ERIC-A e ERIC-B quanto a presença dos genes de virulência, as do grupo ERIC-B apresentaram uma maior frequência de genes de virulência. Todas as 72 linhagens apresentaram os genes *ipaH*, *iuc* e *sigA* (Tabela 8). Especificamente, 11 (32%) das 34 linhagens do grupo ERIC-B apresentaram

além dos genes *ipaH*, *iuc* e *sigA* de um a quatro genes a mais. Já no grupo ERIC-A quatro (10%) das 37 linhagens apresentaram esse perfil (Tabela 15 e Figura 5).

Os resultados do ERIC-PCR e presença de genes de virulência sugerem em conjunto que o subtipo representado pelas linhagens do grupo ERIC-B com similaridade acima de 84,0% possuem um maior potencial patogênico do que o subtipo representado pelas linhagens do grupo ERIC-A com similaridade acima de 82,3%, devido a uma maior frequência de genes de virulência (Tabela 15 e Figura 5) (SERIBELLI et al., 2016).

É importante notar que 13 linhagens (35%) das 37 linhagens do grupo ERIC-A foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e dessas duas foram MDR, isto é resistente a três ou mais classes de antibióticos. Do grupo ERIC-B, 31 linhagens (91%) das 34 linhagens foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e três linhagens MDR que foram indistinguíveis entre si (Tabela 16 e Figura 5). O grupo ERIC-A agrupou sete das 11 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre os anos de 1988 e 2004 que mostraram um perfil de resistência a classe de antimicrobianos β -lactâmicos. Lembrando que a linhagem Sn 25 demonstrou um perfil de resistência aos β -lactâmicos, porém ela não se agrupou em nenhum dos dois grupos pelo método de ERIC-PCR (Tabela 16 e Figura 5). Embora, as taxas de resistência aos β -lactâmicos do presente estudo não tenham sido altas, em qualquer frequência essa resistência é alarmante, podendo levar à falha terapêutica e são um grave problema de saúde pública no Brasil.

De acordo com Koh e colaboradores (2012), o MLVA mostrou-se um método rápido, reprodutível e com um alto nível discriminatório para tipar linhagens de *S. sonnei*, assim sendo esse método pode complementar os dados de PFGE que é considerada uma metodologia eficaz para a tipagem de *Shigella* spp.

O dendrograma de similaridade genética gerado a partir do MLVA alocou as 72 linhagens de *S. sonnei* em dois grandes grupos. O grupo MLVA-A agrupou 31 linhagens de 1983-2014 que apresentaram uma similaridade $\geq 40\%$ e no grupo MLVA-B 41 linhagens de 1983-2014 apresentaram uma similaridade $\geq 21,6\%$ (Figura 6). Portanto, estes dados também sugerem que existam dois subtipos prevalentes nas *S. sonnei* estudadas que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, Brasil, similarmente ao observado com os resultados de tipagem por PFGE e ERIC-PCR.

Ao compararmos as linhagens dos grupos MLVA-A e MLVA-B, as pertencentes ao grupo MLVA-B apresentaram uma maior frequência de genes de virulência (Tabela 15 e Figura 6). Todas as 72 linhagens apresentaram os genes *ipaH*, *iuc* e *sigA*. Especificamente, 12

(29%) das 41 linhagens do grupo MLVA-B apresentaram além dos genes *ipaH*, *iuc* e *sigA* de um a quatro genes a mais em comparação ao MLVA-A. Já no grupo MLVA-A apenas três (10%) das 31 linhagens apresentaram esse perfil (Tabela 15 e Figura 6).

Portanto, os grupos PFGE-B, ERIC-B e MLVA-B possuem linhagens que mostraram um possível maior potencial patogênico em comparação com as linhagens dos grupos PFGE-A, ERIC-A e MLVA-A, possivelmente devido à conservação dos plasmídeos de invasão durante muitos anos, contendo os genes plasmidiais *ipaBCD*, *ial* e *virF* que estão relacionados com a invasão de *Shigella* spp. às células hospedeiras e a ativação do sistema de secreção tipo III que são importantes para a patogênese dessa bactéria (Figura 3, Figura 5, Figura 6 e Apêndice I) (SCHROEDER e HILBI, 2008).

É interessante mencionar que 13 linhagens (42%) das 31 linhagens do grupo MLVA-A foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e dessas duas foram MDR, isto é, resistente a três ou mais classes de antibióticos (Tabela 16 e Figura 3). Do grupo MLVA-B, 32 linhagens (78%) das 41 linhagens foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e três linhagens MDR estão nesse grupo (Tabela 16 e Figura 6). É importante notar que o grupo MLVA-A agrupou sete das 11 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre os anos de 1988 e 2004 que mostraram um perfil de resistência à classe de antimicrobianos β -lactâmicos (Figura 3).

Ademais, os grupos PFGE-B, ERIC-B e MLVA-B possuem um número maior de linhagens que mostraram resistência à tetraciclina e à sulfametoxazol-trimetoprim quando comparado com as linhagens dos grupos PFGE-A, ERIC-A e MLVA-A (Figura 3, Figura 5, Figura 6 e Apêndice I), tal diferença entre as linhagens dos grupos acima citados foi estatisticamente significativa (Tabela 16). Assim sendo, tais taxas de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim e à tetraciclina são preocupantes e podem levar à falha terapêutica quando o tratamento da shigelose é necessário, principalmente em linhagens dos grupos B. Em contraste, quantidades de linhagens MDR foram similares entre os grupos PFGE-B, ERIC-B e MLVA-B e PFGE-A, ERIC-A e MLVA-A, pois no total cinco linhagens foram MDR, sendo duas linhagens nos grupos A e três nos grupos B.

Um estudo realizado no Irã utilizou o método de MLVA para tipar 47 linhagens de *S. sonnei* isoladas de pacientes menores de 12 anos de idade durante 2002 a 2010. As linhagens estudadas foram divididas em dois grandes grupos ao longo dos diferentes anos (RANJBAR e MEMARIANI, 2015).

Na Malásia, Koh e colaboradores (2012), estudaram 40 linhagens de *S. sonnei* isoladas de fezes de pacientes de diversos hospitais desse país durante 1997 a 2008. As linhagens

foram alocadas em dois grupos e 40 MLVA-tipos foram encontrados, ou seja, por meio desse método o índice discriminatório foi de 1,0.

Em contraste, 1672 linhagens de *S. sonnei* isoladas de 50 países em diferentes continentes desde 1943 a 2007 foram estudadas, sendo que o método MLVA alocou as linhagens em três grupos clonais que exibiram diferentes características dos 26 VNTRs pesquisados (FILLIOL-TOUTAIN et al., 2011).

Gorgé e colaboradores (2008), tiparam por MLVA 83 linhagens de *Shigella* spp. e *E. coli* isoladas durante os anos de 1922 a 2000, tais linhagens foram divididas em quatro grandes *clusters* com uma boa diferenciação entre eles.

No Brasil, até o momento não há dados publicados de linhagens de *S. sonnei* tipadas pelo método de MLVA, sendo o nosso resultado pioneiro na utilização de tal metodologia na tipagem dessa bactéria.

Os resultados obtidos pelas técnicas de PFGE, ERIC-PCR e MLVA do presente estudo sugerem que existam dois subtipos prevalentes de *S. sonnei* que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, Brasil (Figura 3, Figura 5, Figura 6 e Apêndice I).

As metodologias de PFGE, ERIC-PCR e MLVA foram eficientes e discriminaram de maneira bastante similar as linhagens de *S. sonnei* estudadas, de acordo com o índice de discriminação (D), o que indica que mesmo organismos monomórficos como *Shigella* spp. são bem discriminados por tais técnicas. Ademais, todas as três metodologias forneceram informações epidemiológicas consistentes e concordantes.

Segundo Urwin e Maiden (2003), o método de MLST foi proposto em 1998 com o intuito de se estudar a evolução e a genética populacional de diferentes patógenos.

Cao e colaboradores (2012), estudaram na China cinco linhagens de *Shigella* spp., sendo duas linhagens de *S. sonnei*, duas de *S. flexneri* e uma de *S. boydii* isoladas de fezes diarreicas em 1983, 2009 e 2010. Os mesmos sete genes *housekeeping* do presente estudo foram amplificados nas linhagens acima citadas. O ST152 foi encontrado em duas linhagens, uma de *S. sonnei* e uma de *S. flexneri*, sendo depositadas no banco de dados da Universidade de Warwick de *E. coli*.

Em contraste, de acordo com Cheng e colaboradores (2014), 50 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre 2007 e 2011 em Nanjing na China foram tipadas pela técnica de MLST, um total de 15 genes *housekeeping* foram amplificados e mostraram um baixo potencial discriminatório em comparação com as técnicas de PFGE e MLVA. O ST114 foi encontrado em 49 linhagens, porém não é possível a comparação com o presente estudo, devido à

utilização de um banco de dados diferente, tais pesquisadores usaram o banco de dados da Universidade do Estado de Michigan de *Escherichia coli* patogênica (EcMLST).

Li e colaboradores (2016), tiparam por MLST 76 linhagens de *S. sonnei* isoladas entre 1974 e 2010 na província de Guizhou, China, um total de 15 genes *housekeeping* também foram amplificados e seis STs foram encontrados, sendo quatro STs novos e dois (ST76 e ST116) que já estavam no banco de dados. O banco de dados utilizado também foi o da Universidade do Estado de Michigan de *Escherichia coli* patogênica (EcMLST), portanto impossibilitando a comparação com o presente estudo.

Todas as 20 linhagens de *S. sonnei* estudadas no presente trabalho foram tipadas como ST152, sugerindo que essas descendam de um precursor comum (Apêndice II). No banco de dados da Universidade de Warwick de *Escherichia coli* existem quatro linhagens ST152 depositadas até 19/09/2016, sendo duas linhagens de *S. sonnei*, isoladas na Alemanha e na China nos anos de 1997 e 2009, respectivamente, além disso, uma linhagem de *S. flexneri* isolada na China em 2009 e uma linhagem de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) isolada no Reino Unido em 2012 (Apêndice III).

Ademais, o ST152 é um *founder*, ou seja, as linhagens ali encontradas são os fundadores principais de um clone, sendo que eles diferem dos outros STs em apenas um único *locus* (SLV). Os SLV do ST152 são principalmente linhagens de *S. sonnei* que descenderam desse ST e que se espalharam por outros locais do mundo, como por exemplo, Alemanha, Vietnã, República Dominicana e Gâmbia. Duas linhagens SLV do ST152 são *S. flexneri* que descenderam desse ST e que estão localizadas na Gâmbia, África (Apêndice IV).

Os DLV do ST152 são particularmente linhagens de *S. flexneri* que descenderam desse ST e que até 19/09/2016 estão localizadas exclusivamente na Gâmbia, África. A outra linhagem DLV é uma *S. boydii* e que também está localizada na Gâmbia, África (Apêndice V).

Portanto, esses resultados sugerem que linhagens de *S. sonnei* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, por mais de três décadas descendem um precursor comum. Similarmente, linhagens de *Shigella* spp. isoladas na Alemanha (Europa), Vietnã (Ásia) e Gâmbia (África) descendem desse mesmo precursor que está distribuído em diferentes continentes. No país, até o momento não há dados publicados de linhagens de *S. sonnei* tipadas pelo método de MLST e depositadas no Banco de Dados da Universidade de Warwick de *Escherichia coli*.

Os resultados como um todo contribuíram para uma melhor caracterização das *S. sonnei* estudadas, isoladas durante 31 anos no Estado de São Paulo, quanto ao seu potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade genotípica.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O potencial patogênico das linhagens estudadas foi destacado pela presença de importantes genes de virulência;
- A alta porcentagem de resistência a alguns dos antimicrobianos testados é preocupante e pode levar à falha terapêutica. Especificamente, as altas taxas de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina são alarmantes por esses poderem ser usados no tratamento da shigelose;
- Os resultados do PFGE, ERIC-PCR e MLVA sugerem que existam dois subtipos prevalentes nas *Shigella sonnei* estudadas que se diferenciaram pouco geneticamente e contaminaram humanos durante 31 anos na região metropolitana de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, Brasil;
- Linhagens alocadas nos grupos PFGE-B, ERIC-B e MLVA-B apresentaram um possível maior potencial patogênico do que as linhagens dos grupos PFGE-A, ERIC-A e MLVA-A, devido a uma maior frequência de genes plasmidiais relacionados à invasão;
- Linhagens alocadas nos grupos PFGE-B, ERIC-B e MLVA-B também apresentaram uma maior resistência à sulfametoxazol-trimetoprim e à tetraciclina em comparação com as linhagens dos grupos PFGE-A, ERIC-A e MLVA-A, sugerindo a presença de um subtipo de *S. sonnei* mais resistente a tais drogas;
- O resultado do MLST indica que as linhagens estudadas de *Shigella sonnei* isoladas no Brasil descendem de um precursor comum;
- As metodologias de PFGE, ERIC-PCR e MLVA foram eficientes e discriminaram de maneira bastante similar as linhagens de *S. sonnei* estudadas, de acordo com o índice de discriminação (D). Ademais, todas as três metodologias forneceram informações epidemiológicas consistentes e concordantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

8. Referências Bibliográficas

AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **Int J Food Microbiol**, v. 168-169, p. 57-62, 2014.

AL-HASANI, K. et al. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2457-63, 2000.

AL-HASANI, K. et al. Genetic organization of the she pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb Pathog**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2001.

ANDERS, K. L. et al. Epidemiology and virology of acute respiratory infections during the first year of life: a birth cohort study in Vietnam. **Pediatr Infect Dis J**, v. 34, n. 4, p. 361-70, 2015.

ANGELINI, M. et al. Molecular epidemiology of *Shigella* spp. strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 685-92, 2009.

ASHIDA, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH Family Effectors as a Versatile Model for Studying Pathogenic Bacteria. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 100, 2016.

BASTOS, F. C.; LOUREIRO, E. C. Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 607-10, 2011.

BELD, M. J.; REUBSAET, F. A. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 123-35, 1995.

BINET, R.; DEER, D. M.; UHLFELDER, S. J. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. **Food Microbiol**, v. 40, p. 48-54, 2014.

BOISEN, N. et al. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.

BOISEN, N. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J Infect Dis**, v. 205, n. 3, p. 431-44, 2012.

BUCHRIESER, C. et al. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 760-71, 2000.

CAMPIONI, F. et al. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American strains. **Int J Food Microbiol**, v. 162, n. 2, p. 174-81, 2013.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **APMIS**, v. 122, n. 3, p. 215-22, 2014.

CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E. O.; SILVA, D. C. V. *Shigella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 42, p. 321-27.

CAO, Y. et al. Multi-Locus Sequence Typing (MLST) and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction (REP-PCR), characterization of *Shigella* spp. over two decades in Tianjin China. **Int J Mol Epidemiol Genet**, v. 3, n. 4, p. 321-32, 2012.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Centers for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**. Acessado em Setembro, 28, 2013, disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Centers for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**. Acessado em Dezembro, 02, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/shigella/fast-facts.html>

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Centers for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**. Acessado em Outubro, 10, 2016, disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/index.html>

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Doenças relacionadas à água ou de transmissão hídrica. Perguntas, respostas e dados estatísticos. p.1-25, 2009.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. *Shigella* spp./Shigeloses. p.1-3, 2013a.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Boletim Epidemiológico do Estado de São Paulo. p.1-19, 2013b.

CHENG, T. et al. Molecular typing of *Shigella sonnei* isolates circulating in Nanjing, China, 2007–2011. **J Infect Dev Ctries**, v.8, n. 12, p. 1525-1532, 2014.

CHIOU, C. S. et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1149-54, 2009.

CHIOU, C. S. et al. A simple approach to obtain comparable *Shigella sonnei* MLVA results across laboratories. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 8, p. 678-84, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA, USA: **CLSI**, 2014.

COLLABORATORS, G. M. A. C. O. D. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117-71, 2015.

CRUZ, C. B. et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 539697, 2014.

DEJLI, J. et al. Comparative analysis of *Shigella sonnei* biotype g isolated from paediatric populations in Egypt, 1999-2005. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 8, p. 1614-24, 2013.

DICKENSON, N. E. et al. Oligomeric states of the *Shigella* translocator protein IpaB provide structural insights into formation of the type III secretion translocon. **Protein Sci**, v. 22, n. 5, p. 614-27, 2013.

DINIZ-SANTOS, D. R. et al. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 77-83, 2005.

DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 768-74, 2000.

DUCHAUD, E. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 11, p. 1307-13, 2003.

DUTTA, S. et al. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 8, p. 667-74, 2001.

DUTTA, S. et al. Molecular characterization of serologically atypical provisional serovars of *Shigella* isolates from Kolkata, India. **J Med Microbiol**, v. 63, n. 12, p. 1696-703, 2014.

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

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **Surveillance of Seven Priority Food- and Waterborne Diseases in the EU/EEA**. Acessado em Dezembro, 02,

2015, disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-surveillance-report-2015.pdf>.

FAHERTY, C. S. et al. Chromosomal and plasmid-encoded factors of *Shigella flexneri* induce secretogenic activity ex vivo. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49980, 2012.

FALCONI, M. et al. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. **EMBO J**, v. 17, n. 23, p. 7033-43, 1998.

FARFÁN, M. J. et al. A new multiplex PCR for differential identification of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* and detection of *Shigella* virulence determinants. **Epidemiol Infect**, v. 138, n. 4, p. 525-33, 2010.

FARSHAD, S.; RANJBAR, R.; HOSSEINI, M. Molecular Genotyping of *Shigella sonnei* Strains Isolated From Children With Bloody Diarrhea Using Pulsed Field Gel Electrophoresis on the Total Genome and PCR-RFLP of *IpaH* and *IpaBCD* Genes. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 1, p. e14004, 2015.

FARUQUE, S. M. et al. Isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 8, p. 3908-13, 2002.

FASANO, A. et al. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **J Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2853-61, 1995.

FERREIRA, L. G.; CAMPOS, L. C.; MARTINEZ, M. B. *Shigella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015. Cap. 42, p. 343-350.

FEIL, E. J. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol**, v. 186, n. 5, p. 1518-30, 2004.

FREITAS, I. C. M. e MORAES, S. A. Economic profile of Ribeirão Preto population: application of the National Economic Indicator. **Rev Saúde Pública**, v. 44, p. 1150-1154, 2010.

FILLIOL-TOUTAIN, I. et al. Global Distribution of *Shigella sonnei* Clones. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1910-2, 2011.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infect Gent Evol**, v. 9, n. 4, p. 430-40, 2009.

FOXMAN, B. et al. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiol Perspect Innov**, v. 2, p. 10, 2005.

FRANKEL, G. et al. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. **Mol Microbiol**, v. 3, n. 12, p. 1729-34, 1989.

GAO, X. et al. Structural insights into VirB-DNA complexes reveal mechanism of transcriptional activation of virulence genes. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 22, p. 10529-41, 2013.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; BAI, J.; NEWELL, E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 2009.

GONZÁLEZ-TORRALBA, A.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; ALÓS, J. I. [Enteropathogens and antibiotics]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 2015.

GORGÉ, O. et al. Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing *Shigella* spp. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 1026-36, 2008.

GU, B. et al. Comparison of resistance to third-generation cephalosporins in *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2012. **Epidemiol Infect**, v. 143, n. 13, p. 2687-99, 2015.

GUYER, D. M. et al. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 53-66, 2000.

HARDY, S. P.; KOHLER, W. Investigating bacillary dysentery: the role of laboratory, technique and people. **Int J Med Microbiol**, v. 296, n. 4-5, p. 171-8, 2006.

HENDERSON, I. R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5587-96, 1999.

HERSHBERG, R.; TANG, H.; PETROV, D. A. Reduced selection leads to accelerated gene loss in *Shigella*. **Genome Biol**, v. 8, n. 8, p. R164, 2007.

HOLT, K. E. et al. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. **Nat Genet**, v. 44, n. 9, p. 1056-9, 2012.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 825-34, 1991.

HUNTER, P.; GASTON, M. Numeral 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.

JIANG, Y. et al. The complete sequence and analysis of the large virulence plasmid pSS of *Shigella sonnei*. **Plasmid**, v. 54, n. 2, p. 149-59, 2005.

KACMAZ, B. et al. Drug resistance profiles and clonality of sporadic *Shigella sonnei* isolates in Ankara, Turkey. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 845-9, 2014.

KAHSAY, A. G.; TEKLEMARIAM, Z. Prevalence of *Shigella* among diarrheic children under-5 years of age attending at Mekelle health center, north Ethiopia. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 788, 2015.

KINGOMBE, C. I.; CERQUEIRA-CAMPOS, M. L.; FARBER, J. M. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Food Prot**, v. 68, n. 2, p. 239-45, 2005.

KOH, X. P. et al. Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. **BMC Infect Dis**, v. 12, p. 122, 2012.

KOPPOLU, V. et al. Small-molecule inhibitor of the *Shigella flexneri* master virulence regulator *VirF*. **Infect Immun**, v. 81, n. 11, p. 4220-31, 2013.

KOSEK, M. et al. Facilitated molecular typing of *Shigella* isolates using ERIC-PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 6, p. 1018-25, 2012.

KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, n. 8, p. 651-66, 1999.

LAMBERTI, L. M. et al. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2705, 2014.

LAN, R. et al. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 69, n. 10, p. 6303-9, 2001.

LAN, R. et al. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5080-8, 2004.

LAN, R.; REEVES, P. R. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. **Microbes Infect**, v. 4, n. 11, p. 1125-32, 2002.

LAWLOR, K. M.; PAYNE, S. M. Aerobactin genes in *Shigella* spp. **J Bacterial**, v. 160, n. 1, p. 266-72, 1984.

LEE, T. M. et al. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, n. 3, p. 173-81, 2003.

LIANG, S. Y. et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Shigella sonnei*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 11, p. 3574-80, 2007.

LIMA, A. A. et al. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 5, p. 1061-5, 1997.

LIMA, I. F.; HAVT, A.; LIMA, A. A. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, n. 1, p. 30-7, 2015.

LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, n. 13, p. 2567-82, 2005.

LINDSTEDT, B. A. et al. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1469-79, 2003.

LINDSTEDT, B. A. et al. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 1, p. 197-205, 2007.

LIU, P. Y. et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 7, p. 1779-83, 1995.

LLUQUE, A. et al. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). **Int J Med Microbiol**, v. 305, n. 4-5, p. 480-90, 2015.

LÜSCHER, D.; ALTWEGG, M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. **Mol Cell Probes**, v. 8, n. 4, p. 285-90, 1994.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 561-88, 2006.

MARTEYN, B. et al. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 355-8, 2010.

MAURELLI, A. T.; BLACKMON, B.; CURTISS, R. Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. **Infect Immun**, v. 43, n. 1, p. 195-201, 1984.

MEDEIROS, M. I. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 21-4, 2001.

Ministério da Saúde (MS). Doenças Infecciosas e Parasitárias. Guia de Bolso. 8ª edição revista. p.1-444, 2010.

MITOBE, J. et al. Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of invE gene expression in *Shigella sonnei*. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 110, 2009.

MOESCH, R. M. e BRIZOLLA, T. Business tourism and events of Ribeirão Preto. **Ministry of tourism**, p. 1-17, 2010.

MOKHTARI, W. et al. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 1, p. 209-22, 2012.

MORRIS, C. R. et al. Characterization of intracellular growth regulator *icgR* by utilizing transcriptomics to identify mediators of pathogenesis in *Shigella flexneri*. **Infect Immun**, v. 81, n. 9, p. 3068-76, 2013.

NADON, C. A. et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. **Euro Surveill**, v. 18, n. 35, p. 20565, 2013.

NAKAYAMA, S.; WATANABE, H. Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* *virF* gene. **J Bacteriol**, v. 177, n. 17, p. 5062-9, 1995.

NATARO, J.P.; BOPP, C.A.; FIELDS, P.I.; KAPER, J.B.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK D. W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington: ASM Press, 2011. V. 1, Cap. 35, p. 603-26.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **J Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 133-43, 2005.

NUNES, M. R. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **J Pediatr (Rio J)**, v. 88, n. 2, p. 125-8, 2012.

NYGREN, B. L. et al. Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998-2008. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 2, p. 233-41, 2013.

OJHA, S. C. et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 412370, 2013.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1661-9, 1999.

ORLANDI, P. P. et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621-5, 2001.

OZMERT, E. N. et al. Clinical characteristics and antibiotic resistance of *Shigella* gastroenteritis in Ankara, Turkey between 2003 and 2009, and comparison with previous reports. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 12, p. e849-53, 2011.

PARIZAD, E. G.; PARIZAD, E. G.; VALIZADEH, A. The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 1, p. DE01-4, 2016.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2005.

PAULA, C. M. et al. Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 966-77, 2010.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 3, p. 301-5, 2005.

PEIRANO, G.; SOUZA F. S.; RODRIGUES D. P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 245-50, 2006.

PENATTI, M. P. et al. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 249-58, 2007.

PORTER, M. E.; DORMAN, C. J. A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. **J Bacteriol**, v. 176, n. 13, p. 4187-91, 1994.

QU, F. et al. Genotypes and antimicrobial profiles of *Shigella sonnei* isolates from diarrheal patients circulating in Beijing between 2002 and 2007. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 2, p. 166-70, 2012.

QU, M. et al. An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 7, p. 904-8, 2014.

RANJBAR, R. et al. The occurrence of extended-spectrum β -lactamase producing *Shigella* spp. in Tehran, Iran. **Iran J Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 108-12, 2013.

RANJBAR, R.; MEMARIANI, M. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for genotyping of *Shigella sonnei* strains isolated from pediatric patients. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 8, n. 3, p. 225-32, 2015.

RAWAL, M. et al. Rapid multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Shigella* spp. using multicolour capillary electrophoresis. **J Microbiol Methods**, v. 83, n. 3, p. 279-85, 2010.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RUEKIT, S. et al. Molecular characterization and PCR-based replicon typing of multidrug resistant *Shigella sonnei* isolates from an outbreak in Thimphu, Bhutan. **BMC Res Notes**, v. 7, p. 95, 2014.

RUIZ, J. e GASCÓN, J. Prevalence of the Sat gene among clinical isolates of *Shigella* spp. causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1565-6, 2002.

SANGEETHA, A. V. et al. Clinical and microbiological profiles of shigellosis in children. **J Health Popul Nutr**, v. 32, n. 4, p. 580-6, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W.D. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANSONETTI, P. J. The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1072, p. 307-12, 2006.

SCHAUMBURG, F. et al. Molecular characterization of *Shigella* spp. from patients in Gabon 2011-2013. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 109, n. 4, p. 275-9, 2015.

SCHUCH, R.; MAURELLI, A. T. Virulence plasmid instability in *Shigella flexneri* 2a is induced by virulence gene expression. **Infect Immun**, v. 65, n. 9, p. 3686-92, 1997.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

SCHWARZ, S. et al. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 4, p. 601-4, 2010.

Superintendência de controle de zoonoses, vigilância e fiscalização sanitária (SCZ). Boletim de Divulgação Técnica e Científica. p. 1–11, 2000.

SHARMA, A.; SINGH, S. K.; BAJPAI, D. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. With reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. **Indian J Microbiol**, v. 49, n. 3, p. 259-65, 2009.

SERIBELLI, A. A. et al. Molecular and phenotypic characterization of strains of *Shigella sonnei* isolated over 31 years suggests the circulation of two prevalent subtypes in São Paulo State, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 65, n. 7, p. 666-77, 2016.

SILVA, T. et al. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 731-3, 2008.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature (Lond)**, 163-688, 1949.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 512-30, 2006.

SOUSA, M. A. et al. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. **APMIS**, v. 118, n. 2, p. 125-35, 2010.

SOUSA, M. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30-5, 2013.

SOUZA, R. A. et al. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. **J Microbiol Methods**, v. 82, n. 2, p. 141-50, 2010.

SURDEANU, M. et al. Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. **Eur J Epidemiol**, v. 18, n. 7, p. 703-10, 2003.

TARTOF, S. Y. et al. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 5860-4, 2005.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 18, n. 6, p. 426-39, 1997.

THE, H. C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 235-50, 2016.

THOMPSON, C. N.; DUY, P. T.; BAKER, S. The Rising Dominance of *Shigella sonnei*: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 6, p. e0003708, 2015.

THONG, K. L. et al. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 8, 2005.

TRAN, C. N. et al. A multifactor regulatory circuit involving H-NS, VirF and an antisense RNA modulates transcription of the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 18, p. 8122-34, 2011.

TROFA, A. F. et al. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 5, p. 1303-6, 1999.

UD-DIN, A. I. et al. Changing trends in the prevalence of *Shigella* species: emergence of multi-drug resistant *Shigella sonnei* biotype g in Bangladesh. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82601, 2013.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 479-87, 2003.

VARGAS, M. et al. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 11, p. 3608-11, 1999.

VERGNAUND, G.; POURCEL, C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. In: Molecular Epidemiology of Microorganisms. **Methods in Molecular Biology**, v. 551, cap. 12, p. 141-158, 2009.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, 1991.

VIDAL, M. et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 10, p. 5362-5, 2005.

VINH, H. et al. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 204, 2009.

VOKES, S. A. et al. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 1, p. 63-73, 1999.

WANG, Y. W. et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 278, 2009.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 6, p. 1156-68, 2006.

World Health Organization (WHO). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. p.1-70, 2005.

WYCKOFF, E. E.; BOULETTE, M. L.; PAYNE, S. M. Genetics and environmental regulation of *Shigella* iron transport systems. **Biometals**, v. 22, n. 1, p. 43-51, 2009.

XIA, S. et al. Prevalence and characterization of human *Shigella* infections in Henan Province, China, in 2006. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 232-42, 2011.

YANG, F. et al. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 19, p. 6445-58, 2005.

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

ZAIDI, M. B. et al. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. **Front Microbiol**, v. 4, p. 288, 2013.

ZHANG, J. et al. Deletion of pic results in decreased virulence for a clinical isolate of *Shigella flexneri* 2a from China. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 31, 2013.

ZHANG, J. et al. Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. from humans in Shanghai, China, 2004-2011. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 78, n. 3, p. 282-6, 2014.

APÊNDICES

Apêndice I – Correlação entre o ano de isolamento, a presença de genes de virulência, a suscetibilidade a antimicrobianos, os grupos obtidos nas metodologias de PFGE, ERIC-PCR, MLVA e o ST encontrado por meio da tipagem de MLST nas linhagens de *Shigella sonnei* estudadas

Linhagens	Ano de Isolamento	<i>ipaH</i>	<i>ipaBCD</i>	<i>ial</i>	<i>iuc</i>	<i>sen</i>	<i>virF</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>pic</i>	<i>sat</i>	Perfil de Resistência	PFGE grupo	ERIC grupo	MLVA grupo	MLST (ST)
Sn 31	1993	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	B	-----
Sn 72	2014	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 41	1996	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 06	1984	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 09	1986	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	B	-----
Sn 24*	1991	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	B	152
Sn 08	1985	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 46*	1998	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	A	A	152
Sn 47	1999	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 38	1995	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	A	A	A	-----
Sn 42	1997	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 44	1997	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	A	B	B	-----
Sn 45	1998	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 58	2003	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 43*	1997	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	A	A	152
Sn 53	2001	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 56	2002	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 57*	2003	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	A	A	152
Sn 12	1987	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 59	2004	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 19*	1990	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	A	A	152
Sn 05	1984	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 10	1986	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT-C	A	A	A	-----
Sn 40	1996	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	B	-----
Sn 18	1989	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 14*	1988	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT-SAM	A	A	A	152
Sn 67	2008	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	NA	A	A	A	-----
Sn 68	2008	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	SXT-NA	A	A	A	-----

Continua

Continuação

Linhagens	Ano de Isolamento	<i>ipaH</i>	<i>ipaBCD</i>	<i>ial</i>	<i>iuc</i>	<i>sen</i>	<i>virF</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>pic</i>	<i>sat</i>	Perfil de Resistência	PFGE grupo	ERIC grupo	MLVA grupo	MLST (ST)
Sn 20	1990	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 01*	1983	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	TE-C	A	A	A	152
Sn 23	1991	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	C	A	A	A	-----
Sn 37	1995	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 60*	2004	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMC-AMP-TE-SXT-SAM	A	A	B	152
Sn 02	1983	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 25*	1992	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	-----	A	152
Sn 03	1983	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	B	-----
Sn 21*	1990	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	PRL-AMP-SXT	A	A	B	152
Sn 07	1985	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	A	A	A	-----
Sn 48	1999	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	A	B	B	-----
Sn 39	1995	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 61	2005	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 51*	2000	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sensível	B	B	B	152
Sn 11	1987	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 26	1992	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 66	2006	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 65	2006	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	B	B	B	-----
Sn 62	2006	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 63	2006	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 28*	1992	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	152
Sn 34	1994	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 55*	2002	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	152
Sn 32	1994	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 54	2002	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 17	1989	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 50	2000	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 27*	1992	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	152
Sn 36	1995	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----

Continua

Conclusão

Linhasgens	Ano de Isolamento	<i>ipaH</i>	<i>ipaBCD</i>	<i>ial</i>	<i>iuc</i>	<i>sen</i>	<i>virF</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>pic</i>	<i>sat</i>	Perfil de Resistência	PFGE grupo	ERIC grupo	MLVA grupo	MLST (ST)
Sn 13	1988	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 16*	1988	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	152
Sn 22	1991	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 64	2006	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 35	1994	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 15	1988	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Sensível	B	B	B	-----
Sn 30*	1993	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	SXT	B	B	B	152
Sn 33	1994	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 49	2000	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	SXT	B	B	B	-----
Sn 69*	2014	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B	152
Sn 70*	2014	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B	152
Sn 71*	2014	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B	152
Sn 29	1992	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----
Sn 04*	1984	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Sensível	B	A	A	152
Sn 52	2001	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	TE-SXT	B	B	B	-----

AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

MLST – realizado apenas para as linhagens com *.

Apêndice II – Ano de isolamento, genes de virulência, perfil de resistência e os grupos obtidos nos dendrogramas gerados a partir da análise dos dados referentes as metodologia de PFGE, ERIC-PCR, MLVA das 20 linhagens ST152 de *Shigella sonnei* tipadas por MLST

Linhagens	Ano de isolamento	Genes de Virulência	Perfil de Resistência	PFGE grupo	ERIC grupo	MLVA grupo
Sn 01	1983	<i>ipaH, ipaBCD, ial, sen, iuc, virF, sigA</i>	TE-C	A	A	A
Sn 04	1984	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	Sensível	B	A	A
Sn 14	1988	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT-SAM	A	A	A
Sn 16	1988	<i>ipaH, ipaBCD, ial, sen, iuc, virF, sigA</i>	TE-SXT	B	B	B
Sn 19	1990	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	A	A
Sn 21	1990	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	A	B
Sn 24	1991	<i>ipaH, ipaBCD, ial, sen, iuc, virF, sigA</i>	Sensível	A	A	B
Sn 25	1992	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	-----	A
Sn 27	1992	<i>ipaH, ipaBCD, ial, iuc, virF, sigA</i>	TE-SXT	B	B	B
Sn 28	1992	<i>ipaH, ipaBCD, ial, iuc, virF, sigA</i>	TE-SXT	B	B	B
Sn 30	1993	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	SXT	B	B	B
Sn 43	1997	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	A	A
Sn 46	1998	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	A	A
Sn 51	2000	<i>ipaH, ipaBCD, ial, sen, iuc, virF, sigA</i>	Sensível	B	B	B
Sn 55	2002	<i>ipaH, ipaBCD, ial, iuc, virF, sigA</i>	TE-SXT	B	B	B
Sn 57	2003	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT	A	A	A
Sn 60	2004	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	PRL-AMP-SXT-SAM	A	A	B
Sn 69	2014	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B
Sn 70	2014	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B
Sn 71	2014	<i>ipaH, iuc, sigA</i>	CTX-PRL-AMP-SXT	B	B	B

AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; NA = ácido nalidíxico; PRL = piperacilina; SAM = ampicilina-sulbactam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; TE = tetraciclina.

Apêndice III – Ano de isolamento, gênero e país das quatro linhagens ST152 provenientes de outros locais do mundo depositadas no banco de dados de MLST para *E. coli* por outros pesquisadores

Linhagens	Ano de isolamento	Gênero	País
16266/97	1997	<i>Shigella sonnei</i>	Alemanha
N6/09	2009	<i>Shigella sonnei</i>	China
3402/10	2010	<i>Shigella flexneri</i>	China
H122780069	2012	EAEC	Reino Unido

Apêndice IV – ST, ano de isolamento, gênero e país das 15 linhagens *single locus variant* do ST152 provenientes de outros locais do mundo depositadas no banco de dados de MLST para *E. coli* por outros pesquisadores

Sequence Typing (ST)	Ano de isolamento	Gênero e Espécie	País
151	1997	<i>Shigella sonnei</i>	Alemanha
241	1991	<i>Shigella sonnei</i>	Sem informação
1272	2002	<i>Shigella sonnei</i>	Vietnã
1502	2004	<i>Shigella sonnei</i>	Sem informação
1503	2004	Sem informação	Sem informação
1504	Sem informação	<i>Shigella sonnei</i>	República Dominicana
1505	2007	<i>Shigella sonnei</i>	Sem informação
1754	Sem informação	Sem informação	França
1755	Sem informação	Sem informação	França
1756	Sem informação	Sem informação	França
1757	Sem informação	Sem informação	França
2395	Sem informação	<i>Shigella sonnei</i>	Gâmbia
2406	Sem informação	<i>Shigella flexneri</i>	Gâmbia
2411	Sem informação	<i>Shigella flexneri</i>	Gâmbia
2421	Sem informação	<i>Shigella sonnei</i>	Gâmbia

Apêndice V – ST, ano de isolamento, gênero e país das quatro linhagens *double locus variant* do ST152 proveniente de outro local do mundo depositadas no banco de dados de MLST para *E. coli* por outros pesquisadores

Sequence Typing (ST)	Ano de isolamento	Gênero e Espécie	País
2391	Sem informação	<i>Shigella flexneri</i> 2a	Gâmbia
2400	Sem informação	<i>Shigella flexneri</i> 2a	Gâmbia
2424	Sem informação	<i>Shigella flexneri</i> 1b	Gâmbia
2429	Sem informação	<i>Shigella boydii</i>	Gâmbia

ANEXOS

Anexo I - Meio de cultura EPM

- Base A:

Triptona (Himedia)	10,0 g
Extrato de carne (BBL)	2,0 g
Cloreto de sódio (Merck)	5,0g
Fosfato de sódio dibásico pentahidratado (Merck)	2,0 g
L-triptofano (Difco)	1,0 g
Sol. alcoólica de azul de bromotimol 1,5% (Merck)	2,0 mL
Ágar (Acumedia)	12,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Todos os constituintes foram adicionados à água, com exceção do ágar e da solução de azul de bromotimol. O pH do meio foi ajustado para 7,4. Acrescentou-se o ágar e aqueceu-se até completa dissolução. Em seguida, foi acrescentada a solução de azul de bromotimol e o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Solução B:

Citrato de ferro amoniacal (Merck)	2,0 g
Tiossulfato de sódio pentahidratado (Merck)	2,0 g
Glicose (Reagen)	10,0 g
Ureia (Difco)	10,0 g
Água destilada	85,0 mL

Os componentes foram dissolvidos em banho de água a 65°C e mantidos neste banho durante 1 hora. Após isso, a solução foi armazenada em frasco âmbar.

- Preparo do meio EPM:

Base A	1000,0 mL
Solução B	17,5 mL

A base A e a solução B foram misturadas assepticamente e 4,5 mL do meio foram distribuídos em tubos de vidro, que foram inclinados de maneira a se obter uma base de, pelo menos, 2,5 cm.

Anexo II - Meio de cultura MILi

Extrato de levedura (Difco)	3,0 g
Peptona (Difco)	10,0 g
Triptona (Himedia)	10,0 g
L-lisina (Synth)	10,0 g
Glicose (Reagen)	1,0 g
Ágar (Acumedia)	2,0 g
Sol. púrpura de bromocresol 1,0% (Merck)	1,25 mL
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Todos os constituintes foram adicionados à água, com exceção do ágar e da solução púrpura de bromocresol. O pH do meio foi ajustado para 6,5. Então o ágar foi adicionado e o meio foi aquecido até completa dissolução. Em seguida, a solução púrpura de bromocresol foi acrescentada e o meio foi distribuído em tubos de vidro e esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.