UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização molecular dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* em diferentes sorotipos de *Escherichia coli* enteroinvasora

Renée de Nazaré Oliveira da Silva

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:
Profª. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização molecular dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* em diferentes sorotipos de *Escherichia coli* enteroinvasora

Renée de Nazaré Oliveira da Silva

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:
Profª. Tit. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2012

Renée de Nazaré Oliveira da Silva

Caracterização molecular dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* em diferentes sorotipos de *Escherichia coli* enteroinvasora

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª. Tit. Marina Baquerizo Martinez
Orientadora/Presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

São Paulo, ___ de _____de_____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com muito AMOR aos meus pais, **Nilson e Renée**, pelo apoio, compreensão, amizade e incentivo em todos os momentos da minha vida. Pai e Mãe vocês são minha base, sem vocês nada disso estaria acontecendo. Agradeço a Deus pela honra de ser filha de vocês. Mais que um exemplo, vocês são meu espelho.

Às minhas queridas e amadas irmãs, **Renaira e Raisa**, sou eternamente grata por ter irmãs tão maravilhosas. Obrigada por todo apoio, companheirismo e incentivo.

Aos meus avós, **Fausta (in memorian), Pedro (in memorian) e Lourdes e João**, vocês são essências para minha formação. Amo vocês.

À minha querida **Tia Rejane** e minhas primas **Juliana e Raielli**, por todo incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe e terá a indescritível alegria de compartilhar, alegria esta que a solidão nega a todos que a possuem."

Deus

Obrigada por se fazer presente em minha a cada minuto, pela força e equilíbrio durante todas as fases da minha vida, e por me permitir viver para criar.

À Profª. Drª. Marina Baquerizo Martinez

Depois de insistir muito você me recebeu em seu laboratório e me deu a oportunidade de estar aqui. Obrigada por sempre acreditar em mim, por ajudar no meu amadurecimento profissional. Minha eterna gratidão.

À técnica Fabiana Teixeira

Fá, minha amiga e companheira de trabalho. Só tenho que agradecer a Deus por ter colocado em minha vida uma pessoa muito especial como você. Obrigada por todos os dias maravilhosos que passei ao seu lado, pelas conversas, risadas, pelos puxões de orelhas e pelos ensinamentos. Você sempre vai estar em meu coração.

Ao Profº. Drº Sandro Rogério de Almeida

Obrigada pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório. Por fazer parte direta e indiretamente deste trabalho.

Ao grupo EIEC

Lucas, você foi mais que um amigo, foi um irmão e chefe. Foi muito bom dividir com você esse momento da minha vida. Obrigada por me tornar um pequeno pedaço seu e sei que pra onde eu for levarei esses ensinamentos sempre comigo, pois como diz meu pai "conhecimento é algo que ninguém te rouba". Obrigada por se fazer presente em minha vida profissional e "pessoal" a todo o momento. Vou levar você em meu coração. Também gostaria de agradecer a sua querida companheira **Alexandra Cassado** que mesmo não estando perto todos os dias me fez sempre sentir o seu carinho que da minha parte é recíproco. Obrigada!!

Hadassa, você foi um dos meus maiores aprendizados. É Hadassa muitas emoções vividas e divididas. Obrigada por dividir comigo os meus primeiros passos na “cidade grande”. Sou muito grata a você e sua família. Obrigada por tudo que vivi com você durante esses anos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório:

Profª. Carla Taddei, pelas palavras e ensinamentos. Obrigada!

Silvia Toledo, Silvinha, Juliana e Lilian. Obrigada pela companhia e pelas risadas compartilhadas. O laboratório com a presença de vocês foi essencial

Aos que já defenderam:

Fernanda, Milton, Isabel. Obrigada pela alegria diária e pelos ensinamentos. Obrigada!

Elizabeth Takagi, obrigada por sempre acreditar em mim, pela amizade e por todo incentivo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micologia

Profª. Karen, obrigada pelas palavras e ensinamentos.

Grasi, Suellen, Lavínia, Telma, Fábio, Zé, Miriam, Poliana e Gilbertinho. Obrigada por vocês estarem ao me lado e pelas conversas animadas. Muito obrigada!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia

Juliana, você sem dúvidas é uma pessoal muito especial na minha vida. Com você dividi o início de tudo dentro do departamento. Obrigada por sempre ser essa pessoa carinhosa e amiga. Tenho uma enorme admiração e um grande carinho por você e sua família. Sou muito grata pela sua amizade.

Artemir, Andrey, Alexandre, Darlan, Leila e Natasha, pelas conversas divertidas e “intelectuais”. Obrigada!

Aos meus queridos amigos: vocês são uma grande parte de mim

Karla Santiago, pelo amor e companheirismo. Com você aprendi muitas coisas e construir um elo fraternal impar. Você é mais que uma amiga é uma irmã. Eu agradeço a Deus todos os dias por ter me permitido te reencontrar. Obrigada minha AMIGA!!!

Sônia, Beto e Felipe Buratto, amo muito vocês. Obrigada por me permitir fazer parte da família de vocês, por fazer de mim uma pessoa melhor. Existem pessoas na vida que já foram predestinadas a se encontrarem e com certeza vocês foram elas em minha vida. Sou eternamente grata por tanto AMOR que vocês têm para comigo. A vocês meu AMOR eterno.

Silene Migliorine, obrigada por tudo minha querida amiga. Você teve uma participação muito importante nesta fase da minha vida e sei que vai estar em muitas outras. Você sempre estará guardada no meu coração. Obrigada!

Franciele Knebel, minha querida amiga. Obrigada por fazer tão presente na realização deste sonho. Deus colocou você no meu caminho para me ensinar como ser determinada. Sem você nada disso estaria acontecendo. Você foi minha luz no fim do túnel. Obrigada sempre.

Luziane Belle, gauchinha querida. Obrigada amiga por todas nossas conversas ao sabor do chimarrão. Obrigada por se presente sempre em minha vida. Obrigada!

Simone Sartoretto, Tainara Sartoretto e Gisele Fachiole, companheiras de todos os dias. Obrigada pela forte amizade que me dedicam. Com vocês o caminho se tornou mais fácil. Sou eternamente grata.

Sonia Maria e Andrea Bordenali, obrigada por sempre me ajudarem no equilíbrio espiritual. Vocês foram imprescindíveis para meu amadurecimento. Obrigada!

Francielli Mahnic, minha amiga, irmã, companheira. Obrigada por sempre me manter equilibrada. Por fazer da nossa casa um LAR. Obrigada por sempre me apoiar. Obrigada por fazer parte da minha vida e permitir que a **Estrela** faça parte dela também. Você é muito especial. Obrigada sempre.

Afonso, Elo, Cissa, Bruna,Fernanda, queridos amigos que fazem parte da minha vida mesmo de longe. Obrigada!

Fernanda Gonsales, minha querida amiga. Obrigada por ser tão presente na minha vida e compartilhar de todos os momentos que ela me oferece.

Alejandro Ferraz, um amigo sempre presente. Obrigada pelo incentivo e pela amizade.

Dayanne, Andressa, Luane, Adriana, Letícia, Jamylle, Barbara, Thiago e Rafael Pontes (in memorian, meu anjinho), meus eternos amigos. O apoio de vocês foi fundamental. Obrigada por sempre estarem presente na minha vida, pela

amizade, pelo carinho, respeito e admiração. A nossa amizade vai além de muitas vidas, o laço que nos une é o mais puro: AMOR.

Às secretárias Ana Dantas, Suely, Dora e Edna.

Às meninas da limpeza Claudinha, Rose, Dona Márcia e as demais funcionárias da limpeza por me proporcionar um ambiente limpo e gostoso para trabalhar, pelo cafezinho de todos os dias.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste sonho.

“Eu tentei 99% e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos mesmo que estes pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

Albert Einstein

RESUMO

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) é um dos agentes etiológicos da disenteria bacilar, caracteriza-se pela destruição do epitélio do cólon provocado pela resposta inflamatória induzida após invasão da mucosa por bactérias. Cepas de EIEC são bioquímica, genética e patogênica semelhante a Shigella spp. A patogenicidade de EIEC e Shigella dependem da presença da pInv plasmídeo, que contém os genes necessários para a colonização bacteriana na mucosa intestinal. Recentemente, demonstrou-se que genes plasmidias *ospC1*, *ospG* e *ospF* de *S. flexneri* estão envolvidos na inibição da resposta inflamatória em células epiteliais intestinais, um fator importante na iniciação da colonização bacteriana e produção de doença. Como a EIEC mostrou doença menos grave, foi analisada as sequências de aminoácido, avaliada a transcrição destes genes plasmídiais e resposta inflamatória modulada por este micro-organismo na célula epitelial intestinal Caco-2. As células Caco-2 foram infectadas em momentos diferentes com 11 sorotipos de EIEC e *S. flexneri* (M90T). Os dados sobre a capacidade de invasão e sobrevivência de bactérias, expressão de genes de bactérias e da quimiocina IL-8 foram obtidos por CFU, RT-PCR, e ELISA, respectivamente. A significância estatística foi avaliada por ANOVA de dois fatores. Os 11 sorotipos de EIEC estudados apresentaram similaridade de 100% com *S.flexneri para OspC1 e OspF,*contudo, foram diferentes na homologia do *OspG.* Quando comparamos as sequências de aminoácido dos 11 sorotipos observamos 100% de similaridade entre eles para OspG, sugerindo o envolvimento destas proteínas na modulação da resposta imune induzida por estes micro-organismos. Os sorotipos de EIEC apresentam diferenças na capacidade de invasão dos enterócitos. Algumas diferenças significativas foram observadas na transcrição dos genes e na produção de IL-8. Os sorotipos de EIEC O29: H-e O167: H-apresentou um baixo transcrição de genes *ospC1* e *ospF*, e um aumento significativo na produção de IL-8 quando comparado com outros sorotipos. Além disso, demonstrou que a maior transcrição destes genes por alguns sorotipos de EIEC parecem estar relacionados com a menor indução de IL-8. Estes dados sugerem que as proteínas OspC1 e OspF desempenham um papel na resposta inflamatória. No entanto, não se observou relação na transcrição *ospG* para a produção de IL-8. Estes resultados sugerem que as proteinas efetoras OspC1 e OspF estão envolvidas na inibição da resposta inflamatória em células epiteliais do intestino favorecendo a invasão da EIEC.

Palavras chave: *Escherichia coli* enteroinvasora. *Shigella flexneri*, OspC1,OspF, OspG, células epiteliais intestinais, resposta inflamatória.

ABSTRACT

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) is one of the etiological agents of bacillary dysentery, it is characterized by the destruction of the colonic epithelium caused by the inflammatory response induced upon invasion of the mucosa by bacteria. Strains of EIEC are biochemical, genetic and pathogenic similar to *Shigella spp*. The pathogenecity of EIEC and *Shigella* depend on the presence of the plasmid pInv, which contains the genes necessary for bacterial colonization in the intestinal mucosa. Recently, it was demonstrated that the plasmid genes *ospC1*, *ospG* and *ospF* of *S. flexneri* are involved in inhibition of the inflammatory response in intestinal epithelial cells, an important factor in the initiation of bacterial colonization and production of disease. As EIEC has showed less severe disease, we evaluated the transcription of these plasmid genes and inflammatory response modulated by this microorganism in the intestinal epithelial cell Caco-2. The Caco-2 cells were infected in different times with 11 serotypes of EIEC and *S. flexneri* M90T strain. The data about sequences of amino acids, invasiveness and survival of bacteria, bacterial genes expression, and chemokine IL-8 were obtained by CFU, RT-PCR, and ELISA, respectively. The statistical significance was evaluated by two-way ANOVA. All EIEC serotypes studied showed 100% similarity with *S.flexneri* to OspC1 and OSPF, however, were different in the homology of OspG. Compared the amino acid sequences of the 11 serotypes observed 100% similarity between them to OspG, suggesting the involvement of them in modulating of the immune response induced by these microorganisms. There were no differences in the invasion the enterocytes among EIEC serotypes. However, some significant differences were observed in the transcription of those genes and production of IL-8. The EIEC serotypes O29:H- and O167:H- showed a low transcription of genes *ospC1* and *ospF*, and a significant increase in production of IL-8 when compared with other serotypes. Furthermore, it was shown that the high transcription of *ospF* and *ospC1* by some EIEC serotypes are related to low induction of IL-8. These data suggested that the proteins OspC1 and OspF play a role in the inflammatory response. However, we did not observed association between *ospG* transcription to the production of IL-8. These results lead us to believe that the effector proteins OspF and OspC1 are involved in inhibition of the inflammatory response in intestinal epithelial cells favoring the EIEC invasion.

Keywords: Enteroinvasive *Escherichia coli*. , *Shigella flexneri*, OspC1, OSPF, OspG, intestinal epithelial cells, inflammatory response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Elementos que regulam a expressão do SSTT do plasmídeo de virulência de *S. flexneri.*	21
Figura 2	Representação esquemática da patogênese da infecção por EIEC.	23
Figura 3	Representação da modulação da proteína efetora OspF na via MPK do Hospedeiro.	26
Figura 4	Gel de agarose com o produto de PCR dos genes ospC1 (600pb) (**A**), ospF (914pb) (**B**) e ospG (760pb) (**C**) dos sorotipos de EIEC.	36
Figura 5	Alinhamento das sequencias de aminoácidos das proteínas OspC1 (**A**), OspF (**B**) e OspG (**C**) nos diferentes sorotipos de EIEC e *Shigella flexneri* 5A (M90T).	39
Figura 6	Ensaio de disseminação bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2.	40
Figura 7	*E*ficiência de amplificação dos genes *ospC1* (**A**), *ospF* (**B**), *ospG* (**C**) em relação ao gene 16S e *nfkB* (**D**) em relação ao gene endógeno 18S.	42
Figura 8	Ensaio da transcrição relativa dos genes *ospC1* dos sorotipos de EIEC e *S. flexneri* após a infecção, de 10 (**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, em células Caco-2.	43
Figura 9	Ensaio da transcrição relativa dos genes *ospF* dos sorotipos de EIEC e *S. flexneri* após a infecção, em 10 (**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, em células Caco-2.	44
Figura 10	Ensaio da transcrição relativa dos genes *ospG* dos sorotipos de EIEC e *S. flexneri* após a infecção, em 10 (**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, em células Caco-2.	45
Figura 11	Dosagem de IL-8, nos intervalos pós-infecção 3 e 6 . *($p<0,05$), **($p<0,01$) e ***($p<0,001$) em relação às células Caco-2 não infectadas e $^{\#}$($p<0,05$), $^{\#\#}$($p<0,01$) e $^{\#\#\#}$($p<0,001$) em relação ao sorotipo O124, em um mesmo intervalo de tempo analisado.	46
Figura 12	Ensaio da transcrição relativa do mediador inflamatório NFkB das células Caco-2 após infecção, em 10 (**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, com sorotipos de EIEC e *S. flexneri* (M90T).	47
Figura 13	Representação esquemática da infecção com *S. flexneri* em células epiteliais intestinais e ativação das proteínas efetoras OspF e OspG.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos diferentes sorotipos *Escherichia coli* enteroinvasora.	28
Tabela 2	Iniciadores para reação de PCR.	31
Tabela 3	Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.	33
Tabela 4	Valor do slope dos diferentes genes para validação experimental pelo método de Delta-Delta Ct para os genes do estudo.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácidos
FDA	*Food and Drug Administration*
MΦ	macrófagos
DC	células dendríticas
SSTT	sistema de secreção do tipo III
°C	graus Celsius
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
AgO	antígeno O
IROMP´S	proteínas relacionadas com o metabolismo do ferro
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasora
VC	vermelho congo
MC	Agar MacConkey
TSB	caldo tríptico de soja
VC+	vermelho congo positivo
VC-	vermelho congo negativo
rpm	rotação por minuto
λ	comprimento de onda
nm	nanômetro
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
SFB	soro fetal bovino
U	unidade
mL	mililitro
μg	microgramas
cm	centímetros
DMSO	dimetilsulfóxido
SST	solução salina tamponada
µM	micro molar
µg	microgramas

CO_2	gás carbônico
g	gravidade
g	gramas
ng	nano grama
nm	nanômetros
µL	microlitros
mM	mili molar
dNTP	nucleotídeos tri-fosfatos
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação polimerase em cadeia
RT-PCR	Transcriptase reversa-PCR
UV	ultravioleta
pb	pares de bases
C	citosina
G	guanina
T	timina
A	adenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	*Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)	16
1.2	Epidemiologia	17
1.3	Mecanismos de Patogenicidade	19
1.4	Reconhecimento do Patógeno	22
1.5	Família osp	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Amostras Bacterianas	28
3.2	Padronização do Inóculo Bacteriano	28
3.3	Cultura Celular	29
3.4	Ensaio de Invasão	30
3.5	Reativação dos Sorotipos de EIEC	30
3.6	Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
3.7	Extração de RNA	31
3.7.1	Síntese de DNA Complementar	32
3.8	PCR em Tempo Real	32
3.9	ELISA	34
3.10	Sequenciamento	34
3.10.1	Análise do Sequenciamento	34
3.11	Análises Estatísticas	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Presença dos Genes *ospC1, ospF* e *ospG*	35
4.2	Caracterização Molecular dos Genes *ospC1, ospF* e *ospG*	36
4.3	Invasão Bacteriana em Células Epiteliais Intestinais Caco-2	39
4.4	Cinética de Transcrição dos Genes *ospC1, ospF*, *ospG* e *nfkB* em Células Epiteliais Intestinais	41
4.5	Produção de Quimiocina IL-8	45
4.6	Transcrição do Mediador Inflamatório	46
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		54
ANEXOS		65
ANEXO A – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospC1*		65
ANEXO B – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospG*		68
ANEXO C – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospF*		71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

A espécie *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae que faz parte da microbiota intestinal do homem e de animais. É um bacilo Gram-negativo, capaz de causar infecções intestinais e extra-intestinais, exercendo um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (DRASAR *et al*., 1974)..

Nos dias atuais, tendo por base uma série de parâmetros, como a produção de fatores de virulência específicos, os tipos de interação com linhagens celulares e a patogenicidade para animais de laboratório, essa espécie possui cepas patogênicas causadoras de infecção gastrintestinal, denominadas *E. coli* diarreiogênicas. Estão divididas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998).

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) é uma das importantes causadoras de Disenteria Bacilar, principalmente em países em desenvolvimento (PACHECO-GIL et al., 2006). EWING e GRAWATTI (1947) apresentaram a primeira descrição de EIEC, onde a partir das fezes de soldados americanos com diarréia durante a segunda guerra mundial foi isolada a primeira amostra de *E.coli*. Em seguida, SERÈNY (1963) demonstrou que essa amostra provocava ceratoconjuntivite em cobaia e pertencia ao sorogrupo O124 (SERÈNY, 1963). O potencial invasor de EIEC pode ser avaliado pela capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaias – ensaio denominado teste de Serèny – e invadem e colonizam as células do cólon intestinal humano, provocando uma infecção semelhante à provocada por amostras de *Shigella spp* (PARSOT et al., 2005, SERÈNY, 1957).

No Brasil, o primeiro caso de infecção por EIEC foi relatado por TRABULSI *et al* (1965). Posteriormente, essa cepa foi identificada como pertencente ao sorogrupo O136 (TRABULSI *et al*., 1969).

Estudos posteriores enfatizam as características bioquímicas particulares de amostras de EIEC no Brasil, por TRABULSI e colaboradores (1967), e no Japão por SAKAZAKI e colaboradores (1967). As 28 amostras estudadas no Brasil pertenciam aos sorogrupos O28, O124, O136, O144 e O152. Destas, 92,8% haviam sido isoladas a partir de casos diarréicos tanto de crianças como de adultos (TRABULSI *et al*., 1967). As amostras do Japão foram isoladas de crianças e adultos com diarréia e pertenciam aos sorogrupos O28, O112, O124, O136, O143 e O144 (SAKAZAKI *et al*., 1967).

As amostras de EIEC se apresentam nos seguintes sorotipos: O28ac:H-, O29:H-, O112ac:H-, O121:H-, O124:H-, O124:H30, O135:H-, O136:H-, O143:H, O144:H-, O152:H-, O159:H-, O164:H-, O167:H- e O173:H- (TRABULSI *et al*., 1967; SAKAZAKI *et al*., 1967; TRABULSI *et al*., 1969; TOLEDO *et al*., 1980; EWING, 1986; GUTH *et al*., 1989; ORSKOV *et al*., 1991; MATSUSHITA *et al*., 1993; NATARO & KAPER, 1998).

A patogenicidade de EIEC é semelhante à de *Shigella flexneri*, no que diz respeito às características bioquímicas e genéticas específicas, que diferem das *E. coli* não invasivas: a EIEC não descarboxila a lisina e tem a presença do gene *ipaH*, similares aos observados no gênero *Shigella*. Somente pelo método de aglutinação com os antissoros específicos é possível diferenciar a EIEC das bactérias do gênero *Shigella* (VAN DEN BELD & REUBSAET, 2011).

Acreditava-se que ambas as bactérias compartilhariam um mesmo ancestral e que num dado momento da evolução o clone formado pelas EIEC seria o elo da cadeia. Entretanto, dados obtidos por nosso grupo (BANDO *et al*., 1998) e outros trabalhos (PUPO *et al*., 1997; ROLLAND *et al*., 1998; LAN *et al*., 2004) nos levam a especular que as amostras de EIEC formam clones distintos dos de *Shigella* e dos outros grupos de *E. coli*.

1.2 Epidemiologia

A diarréia continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo e as enterobactérias *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*

são os agentes etiológicos mais importantes na diarréia infecciosa que acomete a humanidade (W.H.O., 2009).

A epidemiologia de EIEC ainda é pouco conhecida, entretanto existem relatos que mostram que a prevalência não obedece a um padrão de uniformidade. Sendo a maioria das infecções causadas por esta bactéria é através da transmissão fecal-oral de pessoa para pessoa e é geralmente via contato direto. Os dados relatados nos estudos sobre a diarreia mostram uma alta prevalência das infecções por EIEC, dependendo da população investigada (TAYLOR *et al*., 1986; TOLEDO & TRABULSI, 1990; ECHEVERRIA *et al*., 1992; OGUNSANYA *et al*., 1994; PRATS & LLOVET, 1995; TAMURA *et al*., 1996; ALMEIDA *et al*., 1998; VIEIRA *et al*., 2007).

Nos Estados Unidos foram descritos surtos de diarreia, que atingiu cerca de 384 pessoas, sendo relatado como veículo de transmissão o queijo importado da França contaminado com o sorotipo 0124 (MARIER et al., 1973).

Em outros países, seja desenvolvido ou em desenvolvimento, estudos de prevalência também foram realizados. Em Calcutá, a prevalência de EIEC em um grupo de 263 pacientes hospitalizados com diarreia foi elevada, 16,3% dos casos (CHATERJEE & SANYAL, 1984), enquanto na Tailândia, encontraram uma prevalência de 5% entre 200 crianças de 1 a 10 anos de idade (TAYLOR *et al*., 1986). Na China e outros países asiáticos encontrou-se uma prevalência de 7% e 4%, respectivamente (ECHEVERRIA et al., 1992; KAIN et al., 1991; TAMURA et al., 1996). Outros estudos mostraram que na Nigéria (OGUNSANYA *et al*., 1994) e Irã (KATOULI *et al*., 1990) a distribuição de EIEC encontrou-se abaixo das taxas encontradas em países desenvolvidos (menos que 0,1%); na Espanha, por exemplo, foi encontrada uma frequência de 0,2% (PRATS, *et al*., 1995). No Brasil, foram relatos três amostras isoladas de água contaminada (VALENTINI *et al*., 1992), e em seguida, em Portugal foram encontradas amostras de EIEC em água contaminada (CABRAL, 2010).

Até então, não se sabe quais alimentos podem abrigar EIEC, no entanto, existem relatos de surtos associados com hambúrguer de carne e em leite não pasteurizado, mas qualquer alimento contaminado com fezes humanas de um indivíduo doente, seja diretamente ou através de água contaminada, pode causar doença em outros indivíduos (FDA, 2011).

Foram realizadas pesquisas da presença de EIEC na cidade São Paulo, principalmente em crianças de até cinco anos, moradores ou não de comunidades carentes. Foram encontradas 17 amostras em 107 crianças de comunidades carentes com diarreia (15,8%) e em 16 de 701 das crianças não moradoras de comunidades carentes (2,3%). Esses dados também mostram que as condições sanitárias e socioeconômicas podem favorecer o estabelecimento da doença (TOLEDO e TRABULSI,1990). No interior da cidade de São Paulo, foi encontrada baixa prevalência deste microrganismo (OLIVEIRA *et al*., 1989; ALMEIDA *et al.,* 1998).

Recentemente, foram estudados 130 casos em Porto Velho (RO), onde se obteve apenas um isolado (ORLANDI *et al*, 2001). Entretanto, tempos depois, o mesmo grupo analisou amostras de 86 crianças e encontraram 7 casos (1,4%) de EIEC, sendo sua frequência maior do que EHEC (3 casos - 0,6%) (ORLANDI *et al*., 2006). No estado do Rio de Janeiro uma criança de 10 meses de idade, apresentou uma infecção com EIEC sorotipo O143 (REGUA-MANGIA *et al,* 2004). No Nordeste do Brasil, foram analisadas amostras de 290 crianças com diarreia e 290 crianças saudáveis, porém das que apresentavam diarreia apenas cinco crianças foram constatadas com infecção por EIEC (MORENO *et al,* 2010).

Em 2007, VIEIRA e colaboradores, isolaram uma alta prevalência de EIEC numa região no norte do Equador. Porém, essa bactéria tem sido pouco reportada nos tempos atuais como agente etiológico nas pesquisas sobre a diarreia. Pode ser que as análises utilizadas nos laboratórios de rotina não consigam distinguir entre os agentes EIEC e *Shigella,* uma vez que, ambas apresentam uma grande similaridade bioquímica e genética (SILVA et al., 1980; KAPER et al., 2004; PARSOT *et al*., 2005). Talvez por esse motivo, a prevalência de EIEC seja pouco descrita.

1.3 Mecanismos de Patogenicidade

A infecção consiste na invasão e penetração das bactérias nos enterócitos, levando à destruição dos mesmos (LEVINE, 1987). Ambas, se ligam

especificamente à mucosa do intestino grosso e invadem as células epiteliais intestinais por macropinocitose (COSSART & SANSONETTI, 2004).

A invasão e sobrevivência de EIEC no interior das células intestinais é um processo complexo. Para que ocorra o mecanismo de patogenicidade de EIEC na célula epitelial (invasão, multiplicação intracelular e disseminação de célula para célula), é necessário que haja a presença do plasmídio de virulência de 213 kb, denominado pINV (SANSONETTI *et al*., 1982a). Este plasmídio contém 32 genes essenciais para colonização bacteriana. Entre estes genes, estão *ipaA, ipaB, ipaC, ipaD* (antígenos plasmidiais de invasão); *ipgB, ipgC, ipgD* (chaperoninas citoplasmáticas), genes do locus *mxi-spa* (antígenos de transporte e apresentação das Ipas na superfície da membrana celular), os genes reguladores *virF e virB* e genes relacionados à disseminação bacteriana *icsA* e *icsB* (BUCHRIESER *et al*., 2000). O contato da bactéria com a superfície celular do hospedeiro induz à secreção das IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, essenciais na internalização da bactéria e escape do fagossomo na célula do hospedeiro, conduzidas pelo aparato do sistema de secreção do tipo III (SSTT) (MÉNARD *et al*., 1993; COSSART & SANSONETTI, 2004).

Para que ocorra a ativação dos genes plasmidiais é necessária a ação de elementos globais ambientais que ativam o gene cromossomal *H-NS,* este por sua vez ativa o gene plasmidial *virF* que desencadeia uma cascata de regulação de genes plasmidiais (DORMAN *et al*., 2001). Consequentemente, este gene *virF* ativa um grupo composto por reguladores plasmidiais: *virB* e *icsA*. Assim, as bactérias são equipadas com SSTT permitindo a invasão das células do hospedeiro (**Figura 1**) (SCHROEDER *et al*., 2008).

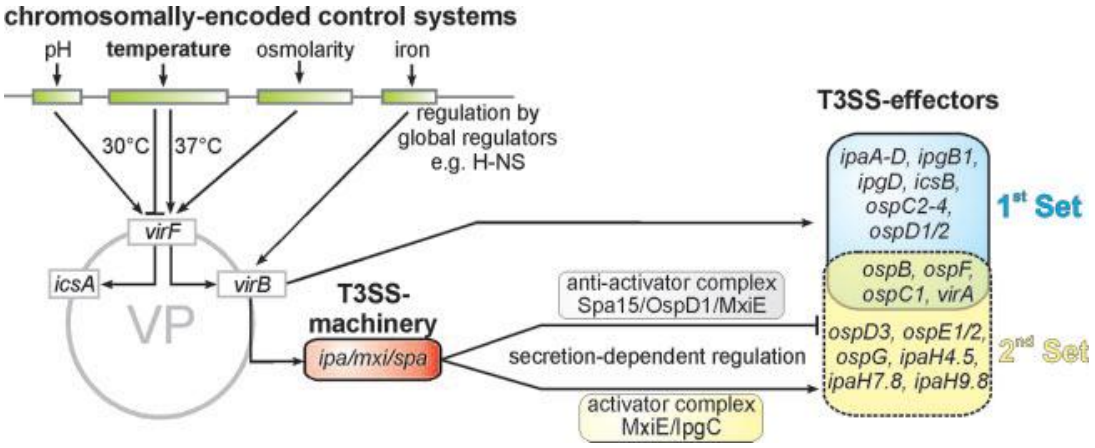


Figura 1: Elementos que regulam a expressão do SSTT do plasmídeo de virulência de *S. flexneri* (SCHROEDER *et al*., 2008).

Estudos mostraram que *S. flexneri* tem como rota de entrada as células M (*microfold cells*) presentes na mucosa intestinal, ao invés de entrar pela porção apical das células epiteliais (SANSONETTI *et al*., 1996). Penetrando pelas células M, a bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória contra as cepas bacterianas. Contudo, a *Shigella* escapa do fagossoma para o citoplasma do macrófago, e a ligação da IpaB (produzida por *Shigella*) com a Caspase-1 (protease presente no citoplasma dos macrófagos) desempenha um duplo papel: a morte dos macrófagos por apoptose, demonstrada *in vitro* (ZYCHLINSKI *et al*., 1992) e *in vivo* (ZYCHLINSKI *et al*., 1996); e a clivagem das citocinas pró-IL-1 e pró-IL-18 em suas formas ativas (HILBI *et al*., 1998; GUICHON *et al*., 2001).

Consequentemente, levando a uma diarréia líquida, com a presença de leucócitos, muco e sangue, frequentemente acompanhada de dor abdominal severa, vômitos, tenesmo, cefaleia, febre, calafrios e mal-estar generalizado. Entretanto, para que ocorra um processo infeccioso, é necessário um inóculo maior de EIEC (10^6) do que de *Shigella flexneri* (10 a 10^2) (DuPONT *et al*., 1971; SANSONETTI, 1982). Esses dados sugerem que a grande diferença no inóculo necessária para a doença (disenteria bacilar) pode estar relacionada com reconhecimento bacteriano e posteriormente resposta inflamatória frente às bactérias.

1.4 Reconhecimento do Patógeno

O reconhecimento bacteriano pelas células do hospedeiro induz uma resposta inflamatória caracterizada pela secreção de uma série de mediadores solúveis, devido à enorme variabilidade e alta taxa de mutações características do microrganismo. Em contrapartida, o sistema imune inato desenvolveu receptores, que têm como alvos estruturas moleculares comuns a grandes grupos de patógenos, ou que são produzidas por patógenos e não pelo hospedeiro. Essas estruturas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 2001). Membros de várias famílias de proteínas funcionam como PRRs e são expressos em células responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo, como as células epiteliais e também as células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

Os PAMPs são reconhecidos por receptores tipo Toll-like (TLR) e Nod-like (NRL). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, como Myd88 e IRAK, que traduzem o sinal, ativando quinase e fatores de transcrição (GAY & KEITH,1991). Entre seus diversos ligantes, os mais caracterizados são os peptidoglicanos (PGN) e lipoproteínas bacterianas (ligantes de TLR2); flagelina, componente do flagelo microbiano (TRL5), LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante TRL4), entre outros (BEUTLER, 2004).

Os receptores NLR têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem diferentes proteínas que apresentam três domínios, um domínio N-terminal variável, um domínio central tipo Nod e uma porção C-terminal com LRR (leucine-rich repeat). A cauda formada pela LRR é reconhecida por padrões e uma cascata de ativação é ativada culminando a ativação do fator de transcrição NF-kB ou da protease caspase-1 dependendo do tipo de receptor recrutado (THIRUMALA-DEVI et al., 2007).

Após o reconhecimento inicial a bactéria escapa dos macrófagos, penetrando na célula intestinal, pelo lado basolateral, e se dissemina para as células adjacentes,

causando uma intensa resposta inflamatória no local, caracterizada principalmente pela secreção da quimiocina IL-8 que, juntamente com IL-1, atua no recrutamento de células do sistema imune inato, principalmente leucócitos polimorfonucleares (PMN). A migração dessas células para o local da infecção causa desestabilização do epitélio intestinal, permitindo, assim, a passagem de um maior número de microrganismos que irão invadir os enterócitos pela superfície basolateral, levando à destruição tecidual (**Figura 2**) (PARSOT & SANSONETTI, 1995; DONNENBERG, 2000; COSSART & SANSONETTI, 2004).

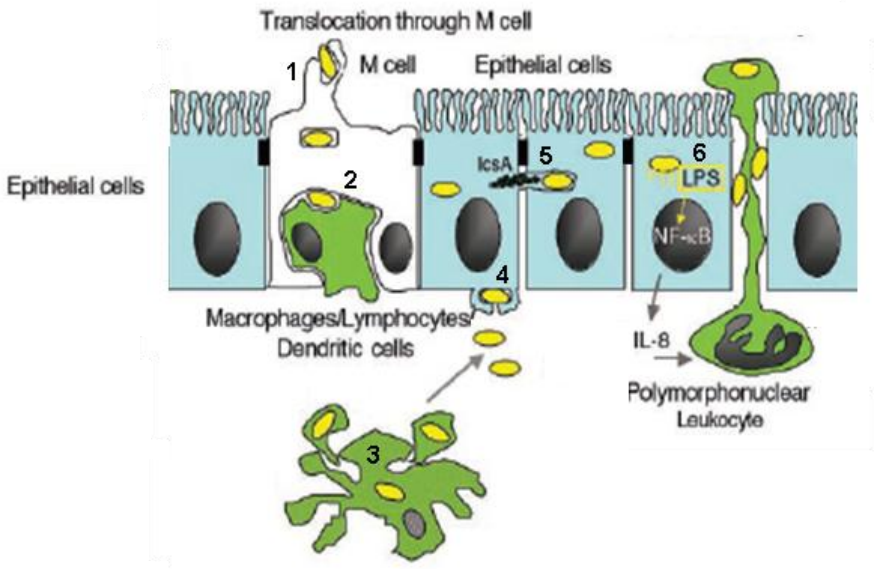


Figura 2: Representação esquemática da patogênese da infecção por EIEC (modificado de COSSART & SANSONETTI, 2004).

A secreção da quimiocina IL-8 tem sido extensivamente relatada durante a infecção por *S. flexneri* e favorece o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (KASPER et al., 2010). Os neutrófilos são células citotóxicas que têm um papel importante na eliminação bacteriana. Os patógenos fagocitados são eliminados pela ação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (BRINKMANN *et al*., 2004). Os neutrófilos , portanto, contribuem para a ruptura da barreira intestinal, e participam na resolução da doença.

Estudos recentes abordando a interação de EIEC com macrófagos J774 e/ou macrófagos peritoniais sugeriram que a doença mais branda causada por EIEC se

deve provavelmente aos menores níveis transcricionais dos genes de virulência desse micro-organismo, que podem resultar em uma menor tradução protéica quando comparado a *S. flexneri* (BANDO *et al*., 2010). Além disso, foi observado que (i) o escape de EIEC do macrófago se dá mais lentamente que o escape de *Shigella*; (ii) na infecção por *Shigella*, parece haver um maior estímulo dos mecanismos imunes inatos, como a produção de NO; (iii) a maior produção de TNF-α e IL-10 após desafio dos macrófagos com EIEC pode estar relacionada com uma eliminação mais eficiente da bactéria; (iv) em ensaios *in vivo*, foi observada uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *Shigella*, enquanto EIEC estimulou um maior produção de IL-10; (v) *Shigella* mostrou ser mais eficiente na geração da resposta imune adaptativa, (vi) a cinética de migração das células mononucleares e polimorfonucleares para o peritônio de camundongos infectados com *Shigella* e EIEC apresentou diferenças significativas (AMHAZ, 2007).

Ao mesmo tempo foram conduzidos estudos sobre a interação de EIEC e *Shigella flexneri* com células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 (MORENO *et al.*, 2009; FERREIRA, 2008). Não foram observadas grandes diferenças na resposta inflamatória induzida por esses microrganismos. Contudo, altas concentrações de óxido nítrico foram secretadas por estas células após infecção com EIEC (FERREIRA, 2008). De maneira interessante, após infecção e disseminação bacteriana nas células intestinais, a expressão dos genes de virulência de EIEC foram significativamente menores que os de *S. flexneri.* Esses dados foram corroborados com os ensaios de disseminação bacteriana, com formação de menores placas de lise na infecção por EIEC (MORENO *et al.*, 2009).

1.5 Família osp

Após o sequenciamento do plasmídeo de virulência pWR100 de *Shigella flexneri* 5a, foram identificados genes que codificam proteínas efetoras que fazem parte do processo de virulência da bactéria. Esses genes foram designados de *osp*: *ospB*, *ospC1*, *ospD1*, *ospE1*, *ospF* e *ospG* (BURHRIESER *et al*., 2000).

A regulação do gene *osp* varia, mesmo entre os homólogos. O*spD1* e *OspD2* são regulados exclusivamente por VirB, OspD3 e OspG são reguladas por MxiE, e

OspF e OspC1, são regulados por ambas as proteínas VirB e MxiE, sugerindo que estas sejam necessárias em todo o curso da infecção (ZURAWSKI *et al*., 2006).

A OspG é uma proteína regulada pelo MxiE que interfere na ativação do NF-kB. Estudos indicam que esta inibe a ativação da Ikbα através do bloqueio da ubiquitina, sem fosforilar a UbcH5. Experimentos de transfecção foram utilizados para investigar o papel do potencial da OspG. A caracterização do fenótipo de um mutante OspG foi usado como modelo de infecção *in vitro* e *in vivo.* Os dados obtidos indicaram que esta proteína esta envolvida na cascata de sinalização diminuindo a resposta inata do hospedeiro, induzida pela bactéria invasiva, permitindo sua presença por mais tempo na célula epitelial (KIM *et al*., 2008).

As proteínas OspF e OspC1 são reguladas pós-transcricionalmente pelas proteínas MxiE e VirB. Os genes estão presentes durante todo percurso da infecção causada pela *S.flexneri* e são dependentes do SSTT. Testes de Sèreny foram realizados com mutantes de ambos os genes. O mutante em *ospc1* demonstrou menor edema e inflamação quando comparado com a cepa selvagem. Além disso, os experimentos com esses mutantes mostraram que as proteínas OspC1 e OspF são essenciais para a sinalização de eventos que estimulam a migração transepitelial de PMN (ZURAWSKI et al., 2006).

Identifica como uma dupla fosfatase específica (DSP- *dually specific phosphatase*), OspF está envolvida diretamente na virulência bacteriana de *S.flexneri*, desfosforilando duas vias específicas MAPKs Erk 1/2 e p38. Uma vez injetada em células epiteliais, se localiza no núcleo e desfosforila MAPKs impedindo a fosforilação da histona H3 consequentemente o fator de transcrição NF-kB não é ativado (**Figura 3**) (SCHROEDER *et al.,* 2008; ZURAWSKI *et al*., 2009).

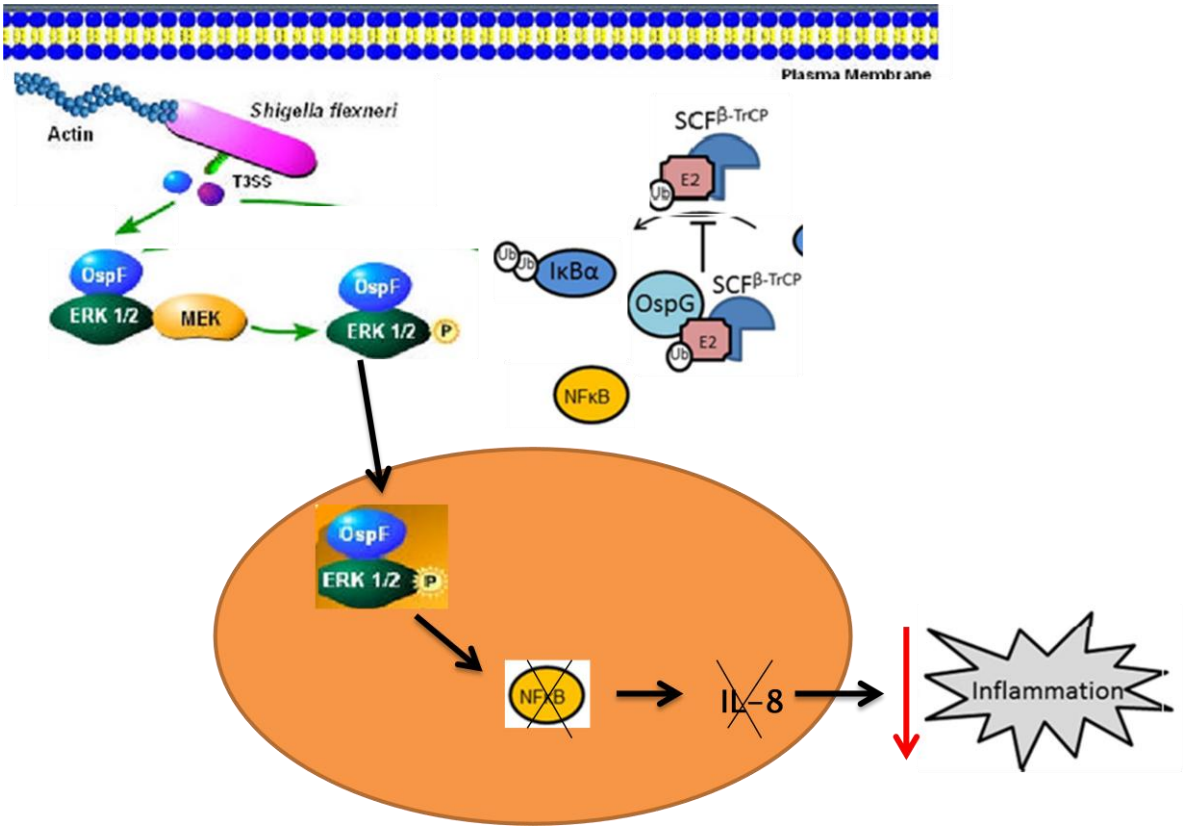


Figura 3: Representação esquemática da infecção com *S. flexneri* em células epiteliais intestinais e ativação das proteínas efetoras OspF e OspG (SCHROEDER *et al.,* 2008; ZURAWSKI *et al*., 2009).

Com base nesses estudos e sua descrição esta voltada somente para *Shigella flexneri* e devido à grande similaridade bioquímica e genética apresentada por essas bactérias (PARSOT, 2005). Fica a pergunta será que EIEC apresenta esses genes que codificam essas proteínas? Será que existe alguma diferença desses genes quando comparados com *S. flexneri*? A grande escassez de dados na literatura deixa sem respostas importantes questões sobre a resposta do hospedeiro na infecção causada por EIEC e, portanto, a proposta deste trabalho é pesquisar a presença destes genes em diferentes sorotipos de EIEC e possivelmente explicar a menor gravidade de casos quando comparada a *S. flexneri*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A proposta deste trabalho é caracterizar a presença dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* em diferentes sorotipos de *E. coli* enteroinvasora, e avaliar seu papel na resposta inflamatória induzida por EIEC.

2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* nos diferentes sorotipos de EIEC por PCR;
- Caracterizar molecularmente os genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* nos diferentes sorotipos de EIEC pela análise de suas seqüências de nucleotídeos;
- Avaliar a cinética da transcrição dos genes *ospC1*, *ospG* e *ospF* nos diferentes sorotipos de EIEC;
- Avaliar a cinética da transcrição do mediador inflamatório NF-kB da célula epitelial infectada com os diferentes sorotipos de EIEC;
- Avaliar a produção da quimiocina IL-8 da célula epitelial infectada com os diferentes sorotipos de EIEC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Foram selecionados diferentes sorotipos de *Escherichia coli* enteroinvasora (**Tabela 1**), isoladas de amostras de fezes de indivíduos com diarréia. As cepas selecionadas foram submetidas ao teste de Serény, para confirmação de sua capacidade invasora. O cultivo das bactérias foi realizado em caldo tríptico de soja (TSB), ágar vermelho-congo (VC) [ágar tríptico de soja, acrescido de 0,02% de corante vermelho congo (Sigma)] (PAYNE & FINKELSTEIN,1977) e em ágar MacConkey (MC), sempre incubados a 37°C em estufa bacteriológica.

Tabela 1: Relação dos diferentes sorotipos *Escherichia coli* enteroinvasora.

Sorotipo	Amostras	Período	Local	Fonte
O28ac:H$^-$	FBC O28/1	-	São Paulo	Fezes
O29:H$^-$	FBC O29/3	1982	São Paulo	Fezes
O112ac:H$^-$	FBC O112/2	1958	CDC-USA	-
O124:H30	FBC O124/4	1968	São Paulo	Fezes
O124:H$^-$	FBC O124/13	1979	Araraquara	Fezes
O136:H$^-$	FBC O136/1	-	São Paulo	Fezes
O143:H$^-$	FBC O143/2	1979	São Paulo	Fezes
O144:H$^-$	FBC O144/2	1966	São Paulo	Fezes
O152:H$^-$	FBC O152/26	1977	Botucatu	Fezes
O164:H$^-$	FBC O164/6	1985	Manaus	-
O167:H$^-$	FBC O167/5	1981	São Paulo	Fezes

3.2 Padronização do Inóculo Bacteriano

Em todos os ensaios de infecção, as amostras de EIEC foram semeadas em ágar Vermelho Congo e incubadas a 37°C, por 48 horas. O corante Vermelho Congo foi utilizado como um marcador de virulência das amostras bacterianas (MAURELLI *et al*., 1984). A coloração vermelho-tijolo das colônias de EIEC é o resultado da precipitação do corante pelas proteínas secretadas pelas bactérias com fenótipo invasivo (BAHRANI *et al*., 1997), sendo utilizada para distinguir amostras invasoras (colônias VC^+) e não-invasoras (colônias VC^-).

Desta forma, foram selecionadas colônias VC^+ para semeadura em caldo tríptico de soja (TSB), sob agitação a 220 rpm a 37°C (agitador *TE-420*, Tecnal, Brasil), por aproximadamente 4 horas, para obtenção da fase logarítimica de crescimento. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura celular (D-MEM). A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro (*Spectronic 20*, Bausch & Lomb) para obtenção de cerca de 10^8 bactérias por mililitro (λ = 625 nm, absorbância 0,01). A densidade bacteriana foi confirmada pela semeadura desta diluição em ágar MC, com posterior contagem de colônias.

3.3 Cultura Celular

Células epiteliais do intestino humano da linhagem Caco-2 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de glicose, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), acrescido de solução antibiótica penicilina-streptomicina (100 U/mL penicilina e 100 μg/mL estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO_2 (GAILLARD *et al*., 1997), em garrafa para cultura celular (75 cm^2). Antes de sua confluência, as células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 24 orifícios (TPP®, Suíça), até sua diferenciação e polarização (10 dias). Os estoques celulares serão mantidos em meio D-MEM, suplementado com 45% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Reino Unido) e, posteriormente, armazenados a – 80°C.

3.4 Seleção de Virulência dos Sorotipos de EIEC

Os diferentes sorotipos de *Escherichia coli* enteroinvasora foram inoculados na cultura de células Caco-2 e incubados por 18 horas. As amostras bacterianas foram recuperadas e semeadas em Agar VC. As colônias mais virulentas foram selecionadas e adicionadas em caldo TSB e, posteriormente armazenadas a -80°C. Estas amostras bacterianas foram utilizadas nos ensaios de infecção.

3.5 Ensaio de Invasão

Os ensaios de invasão foram conduzidos segundo GAILARD & colaboradores (1997), porém com algumas modificações. Após a confluência e diferenciação células em placas de 24 poços, as monocamadas celulares foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 10 Mm Na_2HPO_4; 2mM KH_2PO_4- Sigma, EUA), para a remoção do antibiótico remanescente no meio de cultura e as células foram infectadas com cerca de 2 x 10^5 bactérias por poço. As placas foram centrifugadas a 100x g, por 5 minutos, para favorecer a proximidade entre as bactérias e as células e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 pelo tempo de infecção (60 minutos). Após esse período, o meio de cultura foi removido, para a posterior adição do meio contendo 100 µL/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) e a cultura foi incubada por 60 minutos nas mesmas condições anteriores.

Em seguida as células foram lavadas com PBS e lisadas com Triton X-100 a 0,1 %. Diluições seriadas foram realizadas, semeadas superficialmente em placas contendo Agar MacConkey e incubadas a 37°C, por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados para cada espécie bacteriana.

3.6 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA foi amplificado por PCR, utilizando-se *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima, dNTPs e iniciadores específicos (**Tabela 2**). Para um volume final de 20 µL, utilizar-se-á 1x Solução tampão 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 150µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,4µM de iniciador, 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia), 20ng de DNA e água milliQ estéril para completar o volume final da reação. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) sob condições específicas. O número de ciclos foi padronizado a partir do nível de expressão de cada gene a fim de evitarmos trabalhar com amplificações na região do platô. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1 % em tampão TAE 1x (Trisma-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) e analisados após coloração com brometo de etídio (10□g/mL) sob luz UV. A imagem fotográfica será digitalizada pelo sistema *Photodocumantation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex* 1 - França) e impressa pelo sistema de *Vídeo Graphic UP-895CE* (SONY).

Tabela 2: Iniciadores para reação de PCR.***** >gi|12329037|emb|AL391753.1| Shigella flexneri virulence plasmid pWR100(Pinv Buchrieser,C., Glaser,P., Rusniok,C., Nedjari,H., D'Hauteville,H.,Kunst,F., Sansonetti,P. and Parsot,C.): from 1 to 213494.

Gene	*Forward*	*Reverse*	Tamanho (pb)
ospC1	GGTACTCTGGCTGAAAACAAAGTT	GAACTCAATTTGCTTTCGCTAATTA	600 pb
ospF	AAGGTGGTGTAGCTGGCATC	AGCTGGGAGTGATGTTCCAC	914 pb
ospG	TCGTGTGGAAGGAACATCTG	TTAATATCGCGAGGGAATGG	760 pb

3.7 Extração de RNA

Foi realizado ensaio similar ao item 2.4, para extração do RNA total que foi utilizado no ensaio de PCR em tempo real. Após diferentes tempos de pós-infecção, 10, 30 e 60 minutos, o meio contendo gentamicina (100 µg/mL) foi retirado e a extração do RNA total das células Caco-2 foi realizado utilizando o *Kit RNeasy Mini Kit* (Quiagen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A preparação foi tratado com Dnase (RNase-Free DNase set) (Quiagen).

O RNA total foi quantificado no NanoDrop ND-100 (Unisciense, Brasil) a 260nm, com sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280nm e estocado a -80°C até o momento da utilização.

3.7.1 Síntese de DNA Complementar

O RNA foi diluído até uma concentração final de 500ng/µL para síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se do Kit *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Como iniciadores utilizou-se oligo(DT), que se hibridiza com a cauda poly(A), encontrada na maioria do RNA de células eucarióticas e Random hexamers, utilizada para células procarióticas.

3.8 PCR em Tempo Real

O ensaio de Real Time PCR foi realizado para quantificarmos a diferença dos níveis de mRNA dos genes *opC1*, *ospF*, *ospG* e *nf-kb*. As reações foram feitas para um volume final de 12µL, contendo 3µL da mistura de um dos pares de iniciadores concentração *Forward* e *Reverse* de cada gene, 3µL de cDNA e 6µL de SYBR Green Master Mix (Fermentas). Foram utilizados iniciadores dos genes *opC1, ospF*, *ospG* como controle interno 16S e para o gene de célula eucariotica *nf-kb* foi usado o controle 18S. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY206437.1).

Gene	***Forward***	***Reverse***	**Tamanho (pb)**
ospC1	TGCACCATCAGACGCTAAAG	CTGTCAAGGTGCTCAATAGCC	53pb
ospF	TTCTCAGCAATCTCGTGTGG	ATTGCGAGCATTCCTGATCT	70pb
ospG	AATGGCTTGGCAAGAATCTG	GCTTCATCGCCATAAAAAGC	63pb
16S	GCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAA	GACTCAAGCTTGCCAGTATCAGAT	100pb
nf-kb	GTGACGGGGGATGTGAAG	CTGAGCGTGGAGGTGGAT	101pb
18S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	100pb

O ensaio de Real Time PCR foi realizado no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C para o término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos iniciadores a 60°C por 1 minuto.

Para padronização do ensaio de PCR em tempo real, primeiramente foi estipulada qual a melhor diluição de template para tais reações com a linhagem celular Caco-2. Para isso foram feitos uma mistura de amostras de quantidades equivalentes de cada um dos cDNAs obtidos e foram testadas várias diluições desta mistura de amostras (1:10, 1:20 e 1:30) com três diferentes concentrações de iniciadores (400nM, 600nM e 800nM) de todos genes de interesse.

Para análise da transcrição gênica através de Real-Time PCR foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta$Ct). Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta CT}$, foi necessário comparar a eficiência de amplificação dos genes. Os valores de C_T do gene alvo foram subtraídos dos valores de C_T do gene controle. Foi feito um gráfico da diferença contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (*slope*)

for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, justificando-se assim a utilização deste método de análise de expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

3.9 ELISA

Para avaliação da concentração da quimiocina foi realizado ensaios similares aos descrito no item 3.4 (1 hora de infecção), por diferentes intervalos de tempo de pós-infecção, de 3 e 6 horas para retirada do sobrenadante da cultura celular. A concentração da quimiocina no sobrenadante celular foi determinada por ELISA de captura (R & D Systems), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.10 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado a partir da amplificação do gene, utilizando-se iniciadores para regiões conservadas das proteínas OspC1, OspF e OspG.

Na reação de sequenciamento foi utilizado 20ng do fragmento amplificado, 10pmol de iniciadores (**Tabela 2***)* e o *BigDye®Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A sequência de nucleotídeos dos genes foi analisada pelo Centro de Estudos do Genoma da Universidade de São Paulo - USP, Setor de Sequenciamento de DNA utilizando-se o sequenciador *ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer* (Applied Biosystems).

3.10.1 Análise do Sequenciamento

As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyzer utilizando o Base Caller Cimarron 3.12, BLAST e ClustalW2 (ALTSCHUL, *et al*, 1990).

3.11 Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados através da analise de variância two way ANOVA (teste turkey). As diferenças entre os grupos serão consideradas significativas quando o valor de p for <0.05.

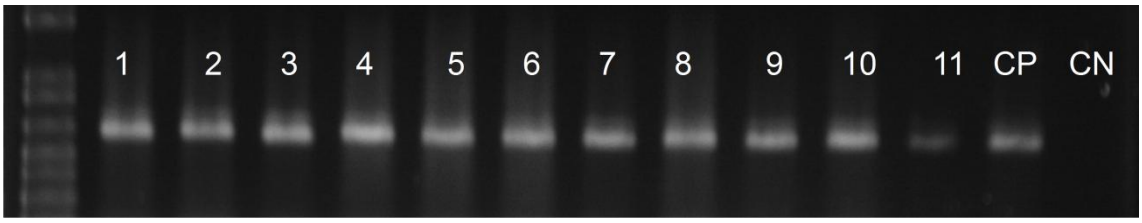
4 RESULTADOS

4.1 Presença dos Genes *ospC1*, *ospF* e *ospG*

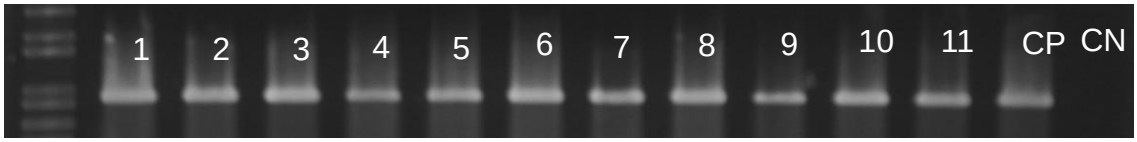
Estudos recentes descrevem algumas proteínas efetoras de *S. flexneri*, entre elas, OspC1, OspF e OspG, que interferem na resposta inflamatória das células epiteliais. Estes efetores atuam na cascata de sinalização destas células, inibindo a produção de mediadores inflamatórios, favorecendo a colonização bacteriana no hospedeiro (Zurawski *et al*., 2006, Kim *et al*., 2008). Apesar da similaridade bioquímica e genética apresentada por EIEC e as espécies de *Shigella* (PARSOT, 2005), a resposta inflamatória induzida por EIEC ainda é desconhecida.

Com isso, resolvemos pesquisar a presença dos genes da família *osp* nos diferentes sorotipos de EIEC que codificam essas proteínas efetoras. Para isso, foram desenhados pares de iniciadores (descritos na tabela), para inicialmente verificar a presença destes genes no DNA plasmidial dos diferentes sorotipos de EIEC, por PCR. Observamos que todos os sorotipos de EIEC analisados apresentaram os três genes avaliados, *ospC1* (**Figura 4A**), *ospF* (**Figura 4B**) e *ospG* (**Figura 4C**), sugerindo a participação destes efetores na patogênese da infecção por EIEC.

(A)



(B)



(C)

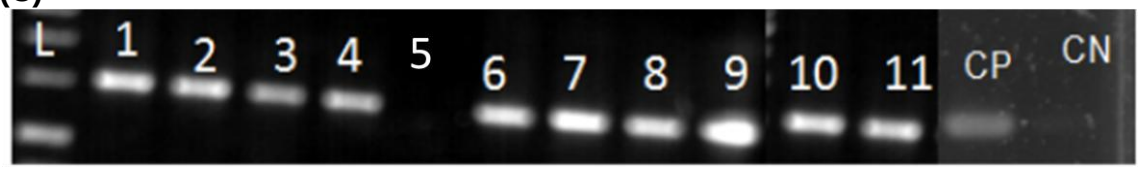


Figura 4: Gel de agarose com o produto de PCR dos genes ospC1(600pb) (**A**), ospF(914pb) (**B**) e ospG(760pb) (**C**) dos sorotipos de EIEC. **1**. O28:H$^-$, **2**. O29:H$^-$, **3**. O112:H$^-$, **4**. O124:H$^-$, **5.** O124:H30, **6**. O136:H$^-$, **7**. O143:H$^-$, **8**. O144:H$^-$, **9**. O152:H$^-$, **10**. O164:H$^-$; **11.** O167:H$^-$; **CP.** Controle Positivo-M90T e **CN.** Controle Negativo-Branco.

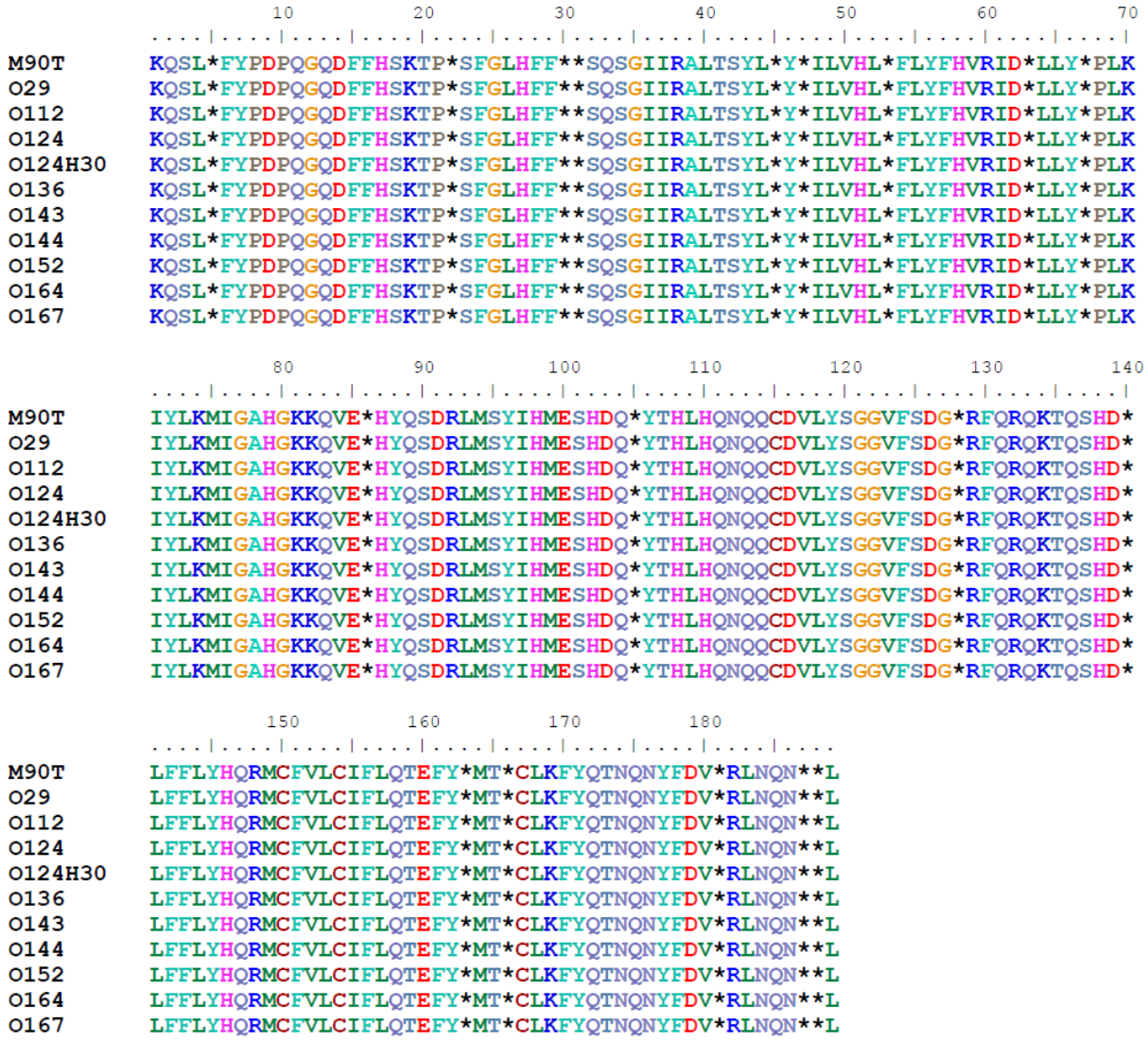
4.2 Caracterização Molecular dos Genes *ospC1*, *ospF* e *ospG*

Após a confirmação da presença dos genes *ospC1*, *ospF* e *ospG* no DNA plasmidial nos diferentes sorotipos de EIEC, decidimos realizar uma análise mais aprofundada dos dados, com a finalidade de confirmar a similaridade com os genes de *S. flexneri*. Para isso, realizamos o sequenciamento de nucleotídeos dos três genes de interesse. Nossos dados mostraram uma similaridade significativa entre os gene *ospC1* e *ospF* dos sorotipos de EIEC e *S. flexneri* 5a (M90T). Entretanto, o gene *ospG* mostrou uma diferença na sequência de nucleotídeos quando comparada a da M90T, mas apresentou 100% de homologia entre os sorotipos de EIEC (Anexo).

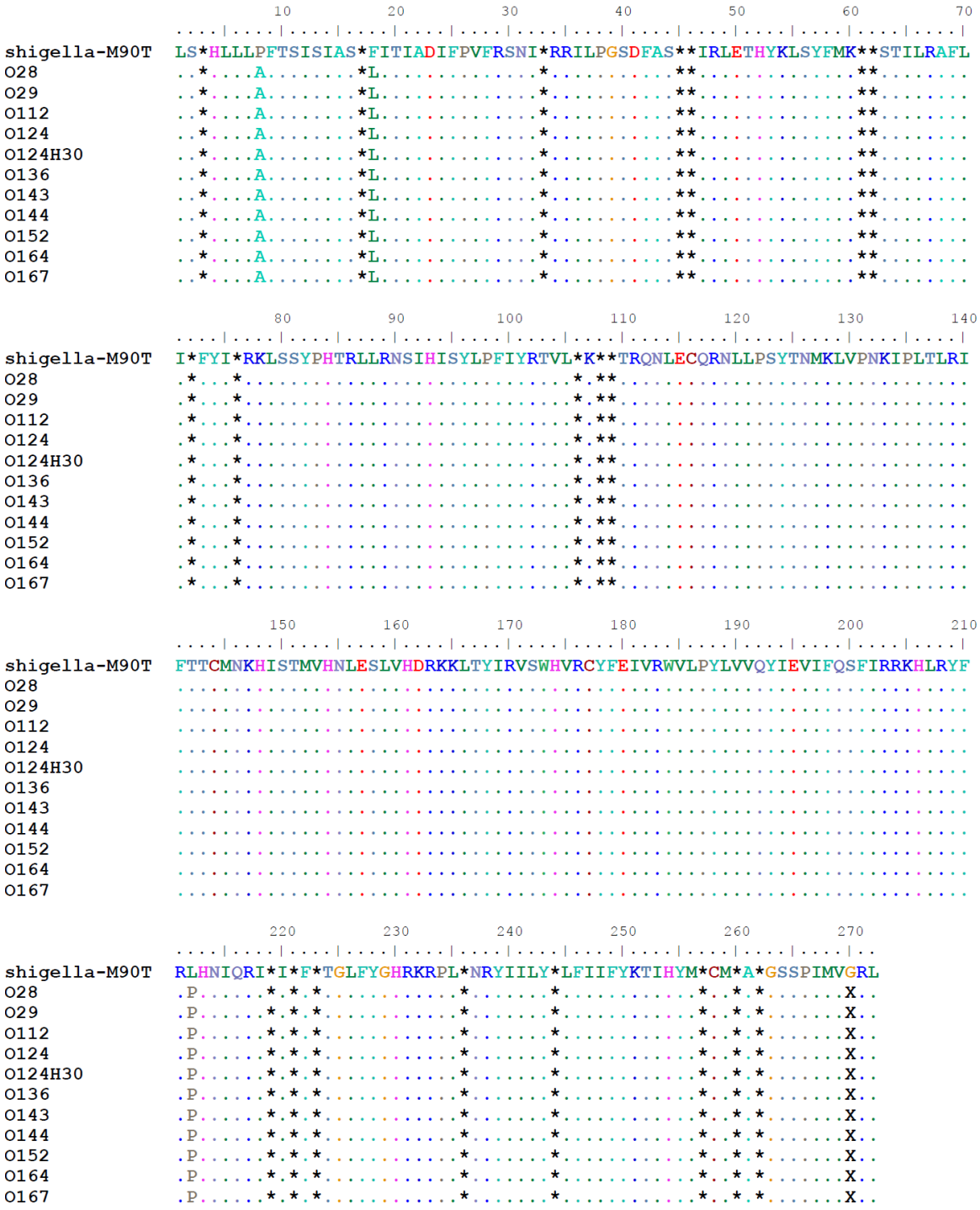
Posteriormente, utilizamos o programa BioEdit (HALL,1999) para transcrever as sequências de nucleotídeos e alinhar as sequências obtidas para uma visualização completa de possíveis mudanças. As sequências de aminoácidos de OspC1 e OspF apresentaram 100% de similaridade quando comparado com os diferentes sorotipos de EIEC e S. flexneri 5a (M90T) (**Figura 5A e 5B**). No entanto, as sequências de aminoácidos da OspG nos diferentes sorotipos de EIEC apresentaram diferenças quando comparada com *S. flexneri* 5a. Contudo, a

comparação entre os diferentes sorotipos de EIEC mostra similaridade de 100% entre eles (**Figura 5C**).

(A) OspC1



(B) OspF


10 20 30 40 50 60 70
shigella-M90T LS*HLLLPFTSISIAS*FITIADIFPVFRSNI*RRILPGSDFAS**IRLETHYKLSYFMK**STILRAFL
O28 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O29 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O112 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O124 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O124H30 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O136 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O143 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O144 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O152 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O164 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
O167 ..*....A.......*L.............*..........**.............**.....
80 90 100 110 120 130 140
shigella-M90T I*FYI*RKLSSYPHTRLLRNSIHISYLPFIYRTVL*K**TRQNLECQRNLLPSYTNMKLVPNKIPLTLRI
O28 .*...*.....*.**.....
O29 .*...*.....*.**.....
O112 .*...*.....*.**.....
O124 .*...*.....*.**.....
O124H30 .*...*.....*.**.....
O136 .*...*.....*.**.....
O143 .*...*.....*.**.....
O144 .*...*.....*.**.....
O152 .*...*.....*.**.....
O164 .*...*.....*.**.....
O167 .*...*.....*.**.....
150 160 170 180 190 200 210
shigella-M90T FTTCMNKHISTMVHNLESLVHDRKKLTYIRVSWHVRCYFEIVRWVLPYLVVQYIEVIFQSFIRRKHLRYF
O28 .....
O29 .....
O112 .....
O124 .....
O124H30 .....
O136 .....
O143 .....
O144 .....
O152 .....
O164 .....
O167 .....
220 230 240 250 260 270
shigella-M90T RLHNIQRI*I*F*TGLFYGHRKRPL*NRYIILY*LFIIFYKTIHYM*CM*A*GSSPIMVGRL
O28 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O29 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O112 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O124 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O124H30 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O136 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O143 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O144 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O152 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O164 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..
O167 .P.....*.*.*.....*.....*.....*..*.*.....X..

(C) OspG

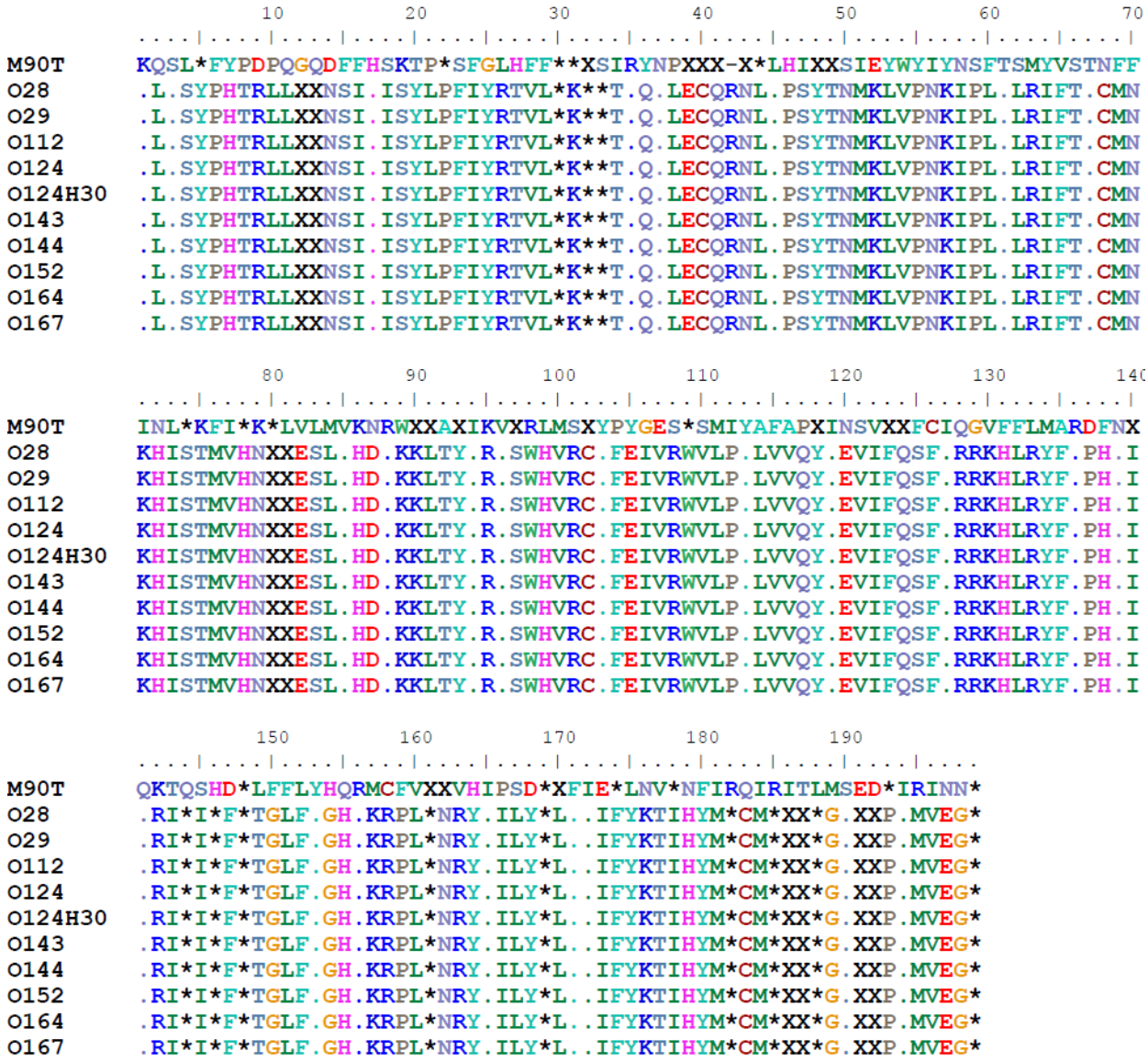


Figura 5: Alinhamento das sequencias de aminoácidos das proteínas OspC1(**A**), OspF(**B**) e OspG(**C**) nos diferentes sorotipos de EIEC e *Shigella flexneri* 5a(M90T).

4.3 Invasão Bacteriana em Células Epiteliais Intestinais Caco-2

No intuito de comparar a eficiência de invasão dos diferentes sorotipos de EIEC em células epiteliais intestinais foram usadas as células Caco-2, mantidas em cultura até a formação de uma monocamada e sua diferenciação. Após esse período, as bactérias foram adicionadas à cultura celular em uma multiplicidade de infecção de 10 bactérias por célula. Após o intervalo de 60 minutos, o sobrenadante da cultura celular foi removido e, por fim, as células foram lisadas para posterior quantificação das bactérias intracelulares dos diferentes sorotipos de EIEC.

Nossos dados mostraram que as cepas dos sorotipos O28:H$^-$, O29:H$^-$, O124:H$^-$, O124:H30, O144:H$^-$, O152:H$^-$, O164:H$^-$ e O167:H$^-$ apresentaram um número maior de bactérias viáveis no interior das células Caco-2 quando comparadas às cepas dos sorotipos O112:H$^-$, O136:H$^-$ e O143:H$^-$.

Nossos resultados sugerem a presença de três grupos de similaridade na capacidade de invasão entre os sorotipos de EIEC: grupo 1(#) O29:H$^-$, O124:H30, O152:H$^-$, O164:H$^-$ e O167:H$^-$, grupo 2 (*) O28:H$^-$, O124:H$^-$ e O144:H$^-$ e grupo 3 (º) O112: H$^-$ e O143:H$^-$ (**Figura 6**).

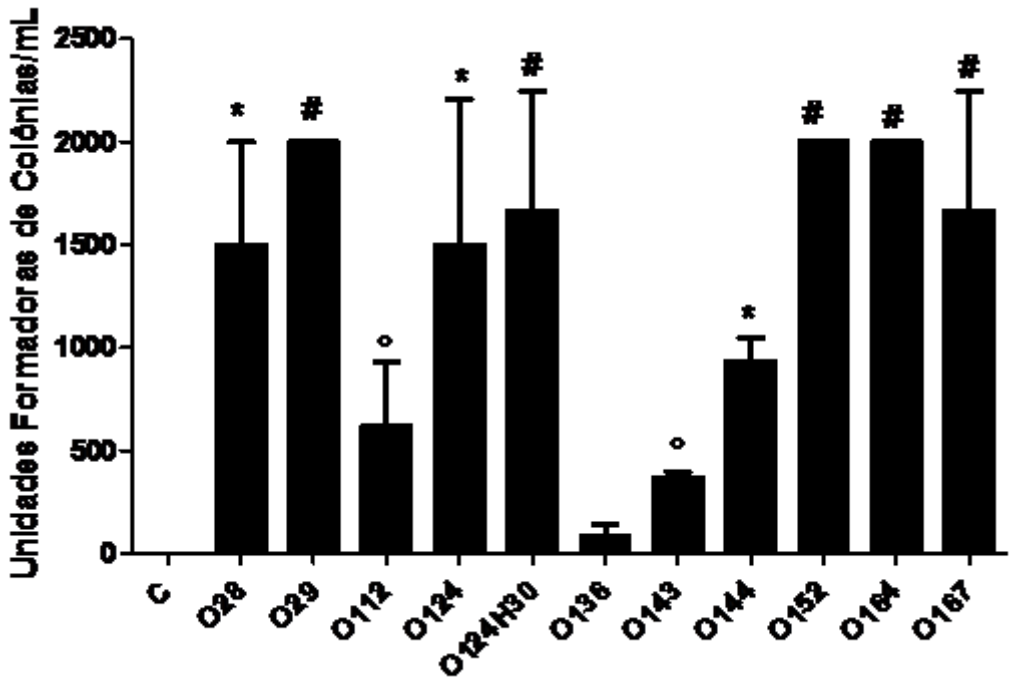


Figura 6: Ensaio de invasão bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2. As células epiteliais intestinais foram infectadas com 10 bactérias por célula dos sorotipos de EIEC, em meio sem gentamicina (infecção). Em seguida, foram lavadas com PBS e depois de 60 minutos as células foram lisadas e semeadas em placas de Agar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades

Formadoras de Colônias (UFC). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. Grupo 1 (#) O29:H-, O124:H30, O152:H-, O164:H- e O167:H-, grupo 2 (*) O28:H- , O124:H- e O144:H- e grupo 3 (º) O112: H- e O143:H-. Pelo método ANOVA foi determinado a similaridade entre os grupos.

4.4 Cinética de Transcrição dos Genes *ospC1, ospF, ospG* e *nfkB* em Células Epiteliais Intestinais

No intuito de avaliar a transcrição dos genes *ospC1*, *ospF* e *ospG*, no curso inicial da infecção nas células intestinais, realizamos a validação do ensaio de q-PCR-RT pelo método de análise descrito por Livak & Schmittgen (2001). O Delta Ct foi utilizado para construir um gráfico contra o logaritmo da diluição de cDNA e calcular a regressão linear destas curvas. Se a inclinação da reta (slope) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação dos controles internos e do gene de interesse são comparáveis, podendo assim utilizar este método para avaliação da transcrição dos genes em questão.

Pode-se observar que o ensaio de qPCR-RT utilizando o método Delta Delta Ct foi validado para análise de transcrição gênica de todos os genes de interesse, uma vez que as inclinações das retas são menores do que 0,1 (**Tabela 4**), mostrando que a eficiência de amplificação dos genes alvos é semelhante à eficiência de transcrição do controle interno (16S e 18S). Além disso, o valor de R^2 foi próximo a 1 (R^2 0,99), mostrando também correlação positiva entre as variáveis, ou seja, entre os genes de interesse e o constitutivo *16S e 18S* (**Figura 7**).

Tabela 4: *Valor do slope dos diferentes genes para validação experimental pelo método de Delta-Delta Ct (Livak & Schmittgen, 2001) para os genes do estudo. Notar todos os valores de slope ou inclinação da reta, inferiores a 0,1.*

Gene	Validação (slope < 0,1)
ospC1	- 0,02
ospF	-0,08

ospG	- 0,20
nfkB	- 0,09

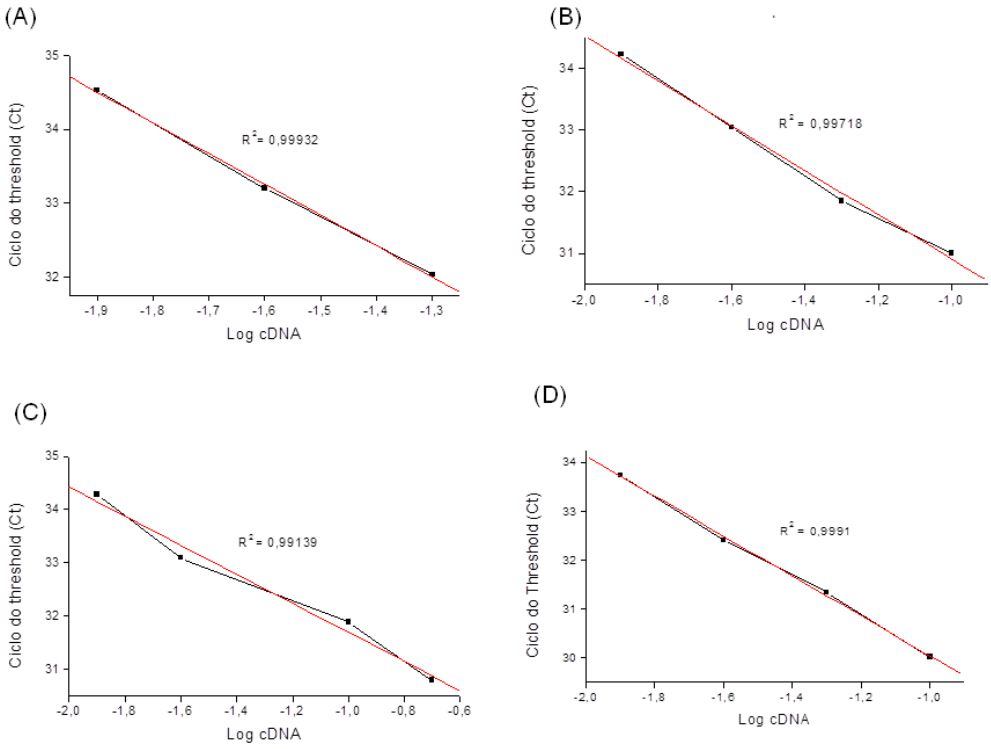


Figura 7*: E*ficiência de amplificação dos genes *ospC1* (**A**), *ospF* (**B**), *ospG* (**C**) em relação ao gene 16S e *nfkB* (**D**) em relação ao gene endógeno 18S. Diluições seriadas de cDNA foram amplificadas por qPCR-RT quantitativo usando iniciadores específicos. Os dados foram ajustados usando análise de regressão linear. Notar os valores de R^2 próximo a 1 para inclinação da reta.

Para avaliação da transcrição dos genes envolvidos na resposta inflamatória dos diferentes sorotipos de EIEC, infectamos células Caco-2, em diferentes períodos de 10, 30 e 60 minutos pós-infecção bacteriana, para extração do RNA e síntese de cDNA procariótica.

A transcrição relativa do gene *ospC1*, no tempo de 10 minutos, foi maior para os sorotipos de EIEC O28:H^-, O143:H^-, O144:H^-, O164:H^- e O167:H^-, quando comparados com *S.flexneri* (M90T), o que não foi observado em 30 minutos (Figura 8A e 8B). No entanto, no tempo de 60 minutos, *S.flexneri* (M90T) apresentou uma

maior expressão em relação aos sorotipos de EIEC (Figura 8C). Entre os sorotipos de EIEC observa-se diferenças na transcrição nos tempos estudados (Figura 8A, B e C).

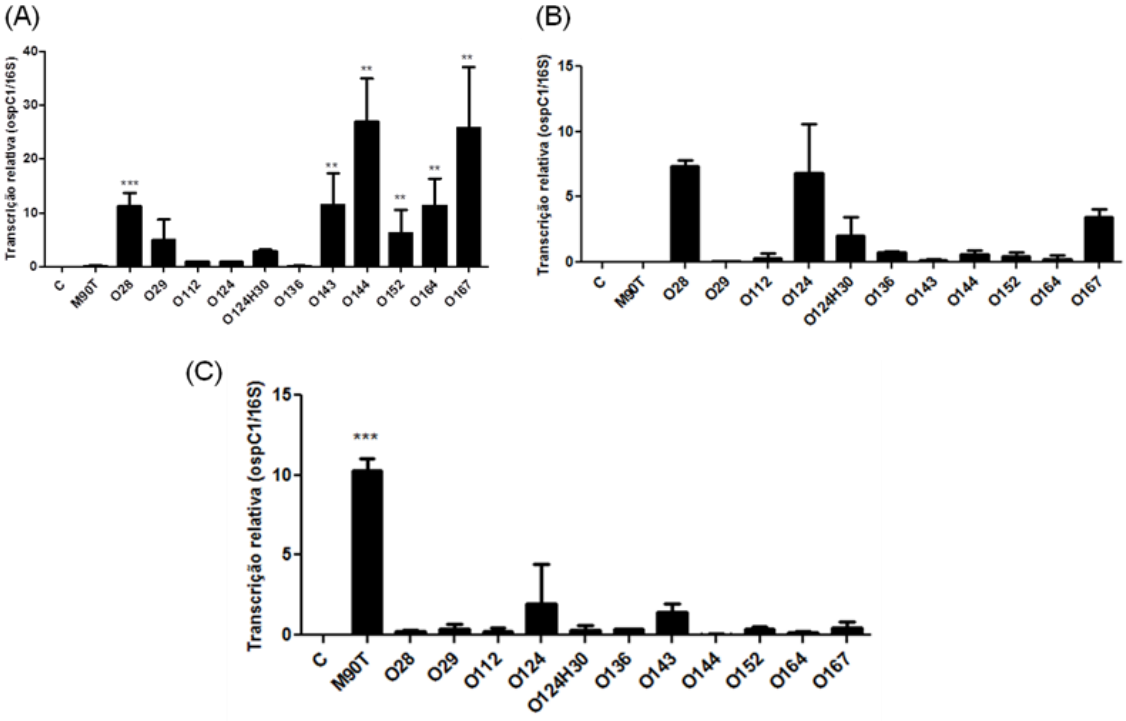


Figura 8: Ensaio da transcrição relativa dos genes *ospC1* dos sorotipos de EIEC e *S.flexneri* após a infecção, de 10(**A**), 30(**B**) e 60(**C**) minutos, em células Caco-2. Como controle foi usado células Caco-2 não infectadas. * (p<0,5), **(p<0,01), *** (p<0,001) em relação ao *S.flexneri* (M90T), em um mesmo intervalo de tempo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Ao analisarmos a transcrição relativa do gene *ospF*, observamos que após 10 minutos de infecção os sorotipos O28:H$^-$, O143:H$^-$ e O144:H$^-$ apresentaram uma maior transcrição quando comparados com M90T. Após 30 minutos de infecção o sorotipo O29:H$^-$ apresentou uma maior transcrição quando comparadas com M90T. Enquanto, que no tempo de 60 minutos M90T apresentou níveis de transcrição maiores quando comprados com os sorotipos de EIEC. Não se observa homogeneidade nos níveis e transcrição deste gene entre os sorotipos de EIEC (Figura 9 A, B e C).

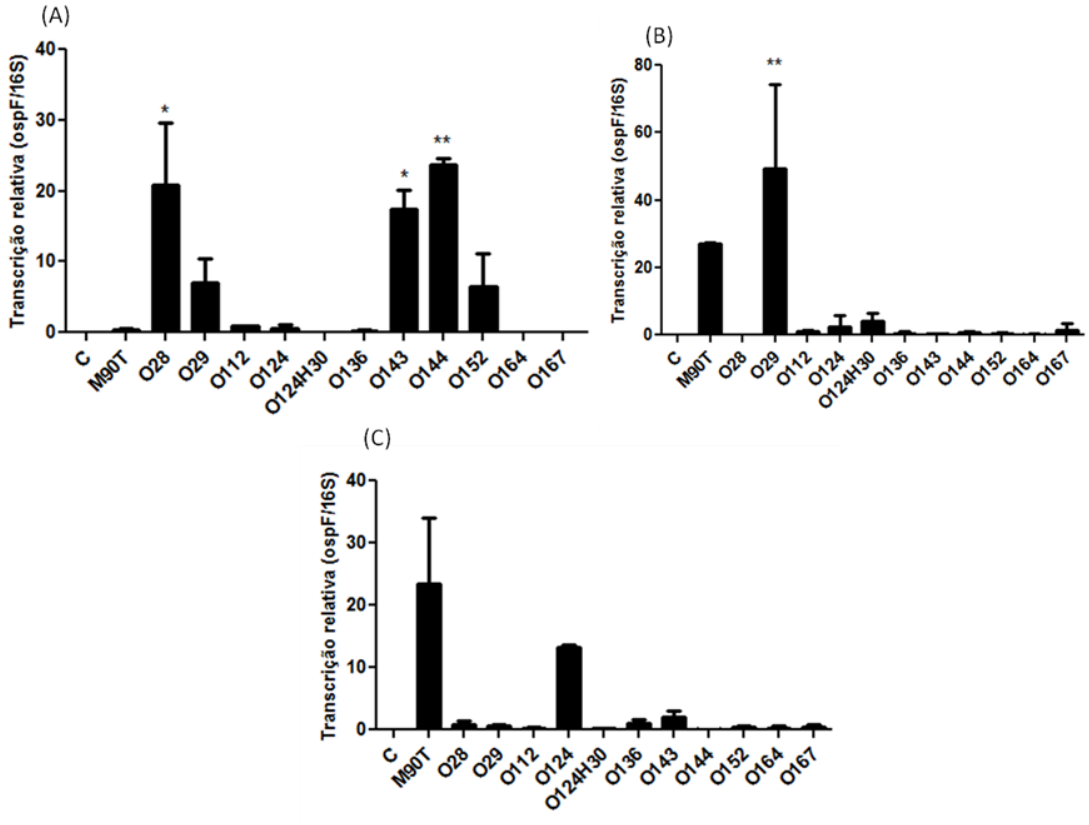


Figura 9: Ensaio da transcrição relativa dos genes *ospF* dos sorotipos de EIEC e *S.flexneri* após a infecção, em 10(**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, em células Caco-2. Como controle foi usado células Caco-2 não infectadas. * (p<0,5), **(p<0,01), *** (p<0,001) em relação a *S.flexneri* (M90T), em um mesmo intervalo de tempo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

A avaliação da transcrição relativa do gene *ospG* pelas células Caco-2 comparando os sorotipos de EIEC com *S. flexneri* (M90T) mostrou que a transcrição do sorotipo O29 :H$^-$ após 10 minutos de infecção foi maior, contudo, no tempo de 30 minutos a foi similar ao da *S. flexneri* (M90T). Em relação aos outros sorotipos de EIEC, a transcrição pela *S. flexneri* (M90T) foi maior após 30 minutos de infecção. Entretanto, após 60 minutos de infecção o sorotipo O144:H$^-$ apresentou maior transcrição quando comparado com *S.flexneri* (M90T) (**Figura 10**).

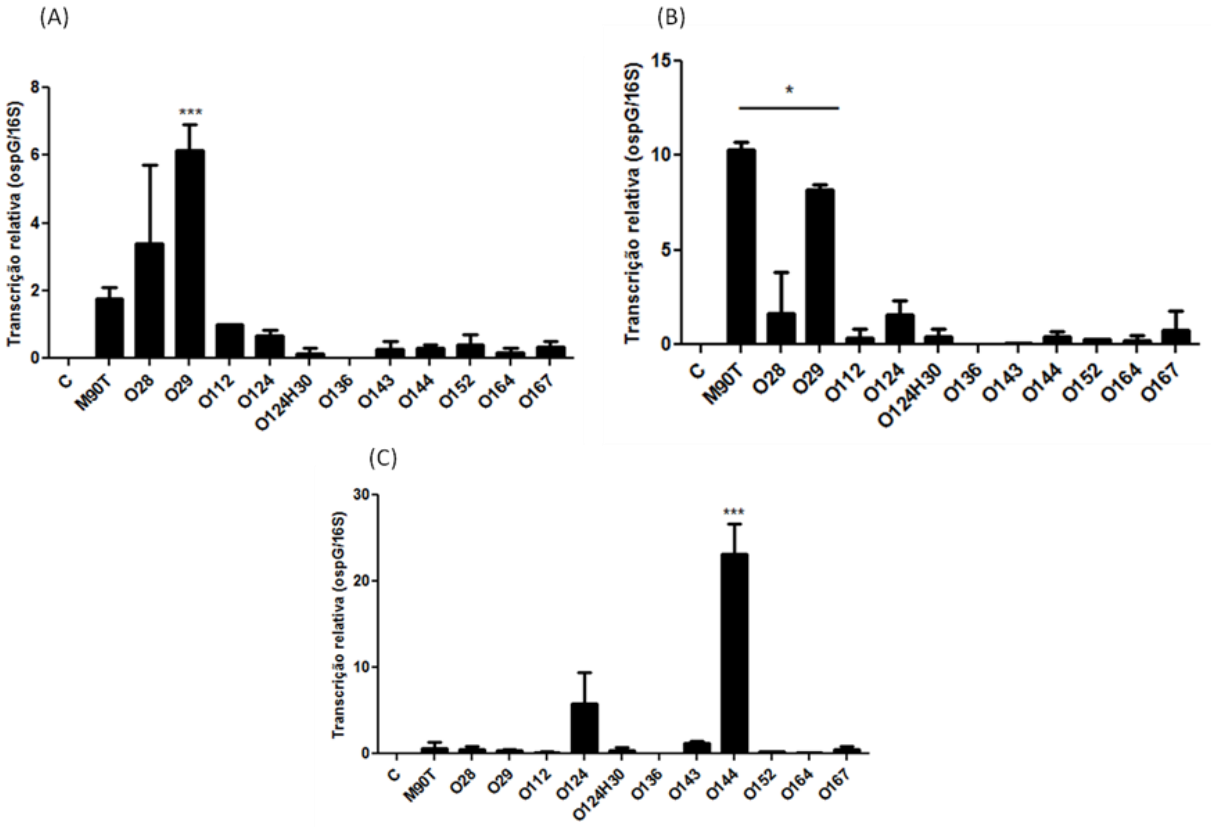


Figura 10: Ensaio da transcrição relativa do gene *ospG* dos sorotipos de EIEC e *S. flexneri* após a infecção, 10(**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, em células Caco-2. Como controle foi usado células Caco-2 não infectadas. * (p<0,5), **(p<0,01), *** (p<0,001) em relação a *S. flexneri* (M90T), em um mesmo intervalo de tempo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

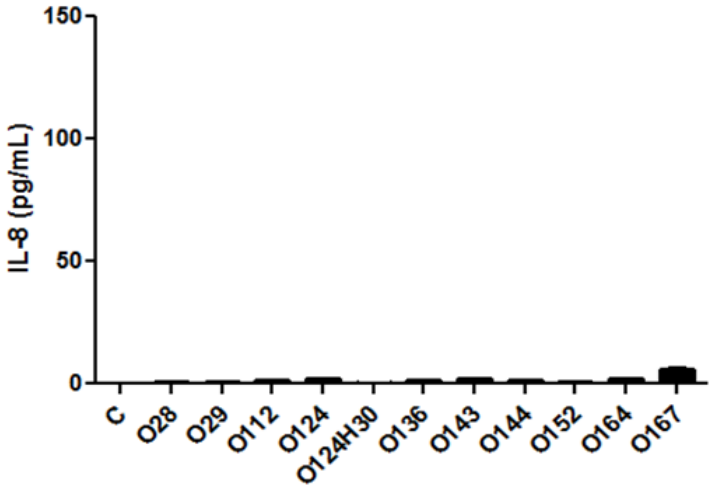
4.5 Produção da Quimiocina IL-8

A próxima etapa foi avaliar a resposta inflamatória das células intestinais infectadas por EIEC. Para isso, as células Caco-2 foram infectadas pelos diferentes sorotipos de EIEC na multiplicidade de 10 bactérias por célula para 3 e 6 horas pós-infecção, para dosagem de IL-8 no sobrenadante da cultura celular.

No intervalo de 3 horas, não houve produção da IL-8 pelas células infectadas por EIEC. No entanto, após 6 horas, a produção de IL-8 foi maior nas células infectadas com os sorotipos O29:H$^-$, O124:H30, O136:H$^-$, O143:H$^-$, O144:H$^-$, O152:H$^-$ e O167:H$^-$ quando comparados com as células não infectadas (produção basal). Os sorotipos O29:H$^-$, O143:H$^-$, O152:H$^-$ e O167:H$^-$ apresentaram uma

produção de IL-8 maior do que as células infectadas com o sorotipo O124:H$^-$ (**Figura 11**).

(A)



(B)

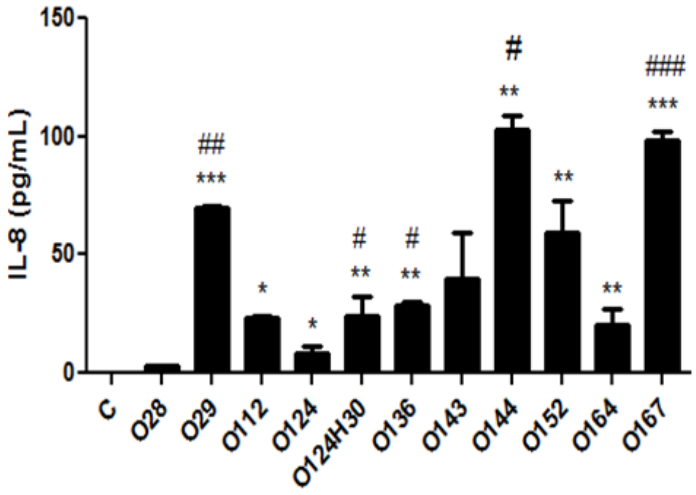


Figura 11: Dosagem de IL-8, nos intervalos pós-infecção 3(A) e 6(B) . *(p<0,05), **(p<0,01) e ***(p<0,001) em relação às células Caco-2 não infectadas e $^{\#}$(p<0,05), $^{\#\#}$(p<0,01) e $^{\#\#\#}$(p<0,001) em relação ao sorotipo O124, em um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados representam a média de três experimentos independentes. Foi usada como controle a célula Caco-2 não infectada.

4.6 Transcrição do Mediador Inflamatório

Com a finalidade de avaliar a transcrição do fator nuclear NF-Kb em células Caco-2 infectadas com os sorotipos de EIEC e *S. flexneri* (M90T), extraímos o RNA da célula eucariótica e realizamos a síntese do cDNA, em 10, 30 e 60 minutos, pós-infecção.

Os dados mostram que após 10 minutos as células Caco-2 infectadas com o sorotipo O28:H$^-$ e O124:H$^-$ apresentaram maior nível de transcrição quando comparados com *S. flexneri* (M90T). Enquanto, que no tempo de 30 minutos (pós-infecção) as células infectadas com os sorotipos O29:H$^-$, O124:H$^-$, O124:H30, O164:H$^-$ e O167:H$^-$ apresentaram níveis de transcrição maiores quando comparados com *S. flexneri* (M90T). Em 60 minutos houve um aumento nos níveis de transcrição das células infectas com o sorotipo O136:H$^-$ quando comparado com *S. flexneri* (M90T) .

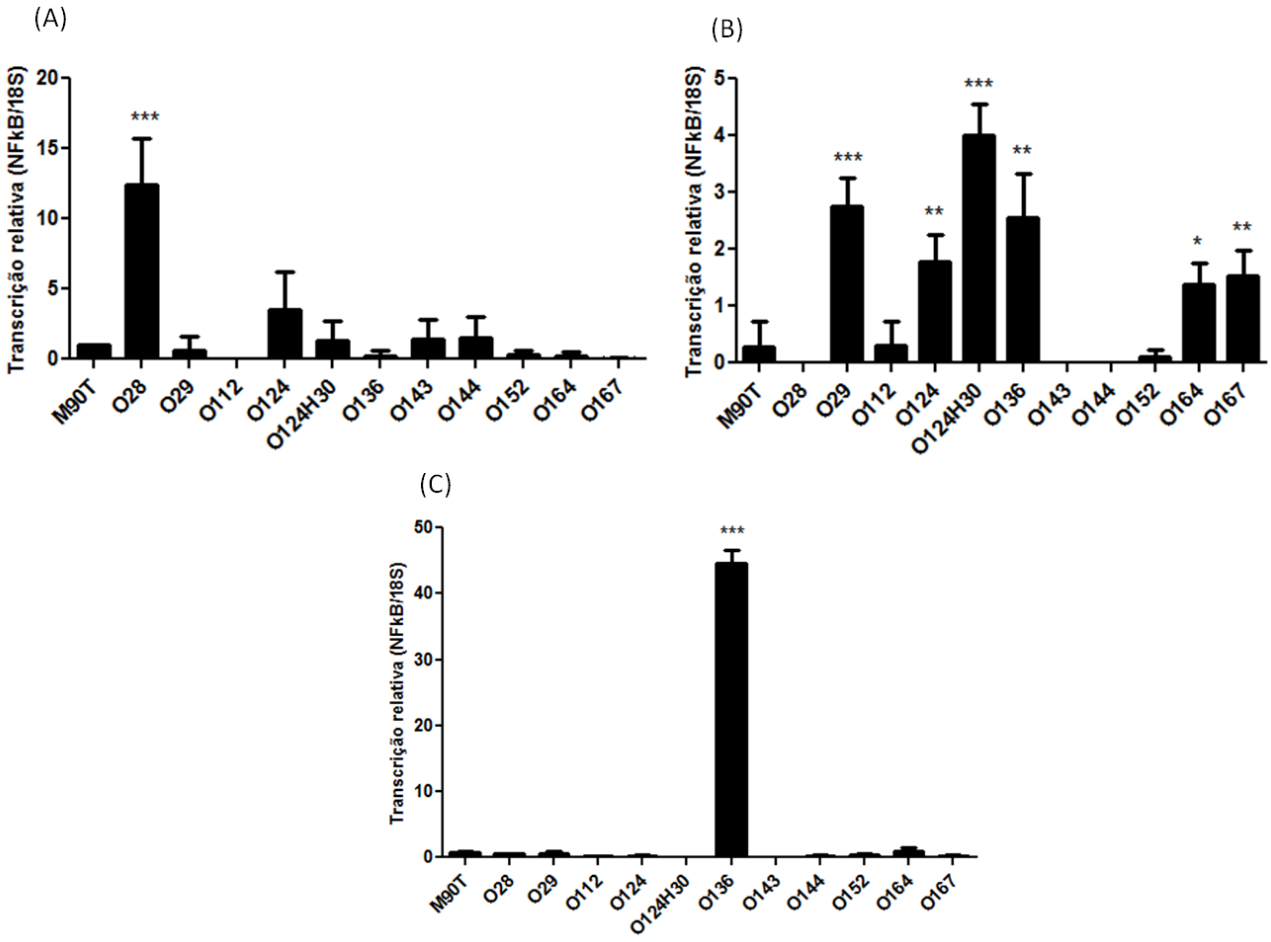


Figura 12: Ensaio da transcrição relativa do mediador inflamatório NFkB das células Caco-2 após infecção, em 10(**A**), 30 (**B**) e 60 (**C**) minutos, com sorotipos de EIEC e *S.flexneri* (M90T). Como

controle foi usado células Caco-2 não infectadas. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) em relação ao *S.flexneri* (M90T), no mesmo intervalo de tempo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A disenteria bacilar é caracterizada pela destruição da mucosa do cólon intestinal o que é induzido pela resposta inflamatória após o reconhecimento bacteriano devido à ativação de células fagocíticas com macrófagos e células dendríticas. Entre os micro-organismos que causam essa síndrome, EIEC e *Shigella* são os agentes etiológicos mais importantes (KOTTLOF *et al*., 1999, ASHIDA *et al*., 2011).

Neste trabalho, foi escolhido como modelo experimental células epiteliais intestinais humanas da linhagem Caco-2, que mimetizam o microambiente intestinal do hospedeiro. Após invasão bacteriana nas células epiteliais foram analisadas a transcrição dos genes *ospC1, ospF* e *ospG*, transcrição do mediador inflamatório NF-kB e secreção de mediadores pró-inflamatório.

Após a invasão, a bactéria escapa do vacúolo e ganha acesso ao citoplasma, onde ocorre sua proliferação e penetração para as células adjacentes. O ciclo termina quando ocorre a lise da dupla membrana, a fim de liberar a bactéria no citoplasma da célula adjacente (COSSART & SANSONETTI, 2004). Recentemente, nosso grupo comparou o número de bactérias viáveis de *Shigella* e EIEC dentro das células Caco-2 após um período de 2 horas pós-infecção e não houve diferença significativa entre a concentração destas bactérias. Contudo, no período de 4 horas pós-infecção foi observado um aumento do número de bactérias no interior das células Caco-2 infectadas com *S.flexneri* (FERREIRA, 2008, MORENO et al., 2009).

A partir destes dados, determinamos o número de bactérias viáveis no interior das células Caco-2 quando infectadas com diferentes sorotipos de EIEC. Os dados obtidos mostraram que durante o período avaliado a capacidade de invasão entre os sorotipos foram diferentes, separados em grupos: grupo 1. O29:H^-, O124:H30, O152:H^-, O164:H^- e O167:H^-, grupo 2. O28:H^- , O124:H^- e O144:H^- e grupo 3. O112: H^- e O143:H^- . Estes dados corroboram os encontrados por nosso grupo, que observaram que existem diferenças na capacidade de disseminação entre os sorotipos de EIEC e quando comparada com *S. flexneri* (FERREIRA, 2008, MORENO et al., 2009, SANTOS, 2012).

A partir do sequenciamento do plasmídio de virulência de *S. flexneri* sorotipo 5a (M90T), foi descritos proteínas efetoras da família Osp, que fazem parte do mecanismo de virulência de *S. flexneri*, presentes no plasmídio pINV e modulam a resposta inflamatória favorecendo a bactéria (Buchrieser *et al*., 2000, Arbibe, L. et al., 2007). Entre essas proteínas efetoras da família Osp, encontra-se as OspC1 e OspF, que estão envolvidas na cascata de sinalização da MAK quinase, estas proteínas são reguladas por VirB e MxiE. OspG regulada pela proteína MxiE, está envolvida na cascata da sinalização da ubiquitina (Zurawki et al., 2006, ARBIBE et al., 2006, KIM *et al*., 2008).

Sabendo da importância destas proteínas efetoras para a virulência de *S. flexneri* e devido à semelhança genética e bioquímica entre *Shigella* e EIEC, fomos verificar a presença dos genes *ospC1*, *ospF* e *ospG* nos diferentes sorotipos de EIEC. Quando analisamos as sequências dos aminoácidos das proteínas, OspC1 e OspF, estas apresentaram 100% de similaridade quando comparadas com os diferentes sorotipos de EIEC e *S. flexneri*. No entanto, as sequências de aminoácidos da proteína OspG nos diferentes sorotipos de EIEC apresentaram diferenças quando comparadas com *S. flexneri*. Sugerindo uma possível diferença na conformação desta proteína.

Kim e colaborados (2008), avaliaram o níveis de transcrição do gene *ospF* em 0, 30 e 60 minutos, após a invasão de *S. flexneri* em células dendriticas, nos níveis de transcrição em 60 minutos foi maior quando comparados com os tempos anteriores, indicando a participação do gene *ospF* depois da invasão. Estudos com células HeLa demonstraram que a proteína OspG presente em *S. flexneri* impede a fosforilação da via ubiquitina, contribuindo com a permanência da bactéria dentro das células epiteliais (KIM *et al*., 2005).

No intuito de avaliar o papel dos genes *ospC1*, *ospF*, *ospG* na resposta imune das células epiteliais, analisamos os níveis de transcrição em 10, 30 e 60 minutos após infecção. Observamos que os nosso laboratório que os níveis de transcrição do regulador *virB* foi menor para EIEC quando comparado com *S. flexneri* após 60 minutos de infecção (BANDO *et al.,* 2010). Os sorotipos de EIEC apresentam níveis de transcrição maiores nos tempos 10 e 30 minutos, enquanto que *S. flexneri* apresenta a partir de 60 minutos. Foi demonstrado em dados

explicam as diferenças na transcrição dos genes *ospC1* e *ospF* entre os sorotipos de EIEC e *S. flexneri* no tempo de 10 minutos pós infecção.

Ao analisarmos a transcrição do gene *ospG* nas células infectadas, observamos que o sorotipo O29:H$^-$ de EIEC e *S. flexneri* apresentam níveis de transcrição similares nos tempos de 10, 30 e 60 minutos. Porém, os outros sorotipos de EIEC apresentam níveis de transcrição maiores a partir de 30 minutos, com exceção do sorotipo O136:H$^-$ que não transcreve este gene. O importante papel da proteína OspG é a inibição da via ubiquitina, através da inibição da fosforilação de Ik-bα resultando em uma menor resposta imune inata do hospedeiro (KIM *et al*., 2008). Os nossos dados demonstram que a diferença detectada na estrutura desta proteína entre os sorotipos de EIEC e *S. flexneri* podem levar a uma modulação negativa da via ubiquitina, resultando na maior produção de NF-kB,e possivelmente uma resolução mais rápida da doença causada por alguns sorotipos de EIEC

A presença destas proteínas efetoras no curso da infecção de EIEC e *S. flexneri* está relacionada com os níveis da secreção da quimiocina IL-8. Para que ocorra a secreção da IL-8 é necessária à ativação de vias pró-inflamatória NF-kB, JNK, ERK, e p38 (KASPER *et al*., 2010). O fator nuclear NF-kB participa de vários eventos importantes do processo da resposta celular, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-infalamatórias. EIEC e *S. flexneri* invadem células epiteliais e liberam PGN que são reconhecidos pelo receptor Nod1 que desencadeia uma cascata de sinalização, ativando o NF-kB, que direciona uma resposta inflamatória severa (ASHIDA *et al*., 2006). As proteínas efetoras OspF e OpsG são essenciais para o silenciamento das bactérias intracelulares e estão presentes durante todo percurso da infecção (KIM *et al*., 2008, KIM *et al*., 2005, ZURAWASKI *et al*., 2009) (**Figura 13**).

Os níveis de transcrição de NF-kB após 10, 30 e 60 minutos de infecção foram avaliados por qPCR-RT. Nossos resultados mostraram que as células Caco-2 infectadas com os diferentes sorotipos de EIEC apresentaram maiores níveis transicionais nos tempos estudados, quando comparados com *S. flexneri*. Tendo em vista a maior transcrição dos genes *ospC1* e *ospF* por alguns sorotipos de EIEC, estes resultados sugerem a participação das proteínas OspC1 e OspF, pela via MAPKs, nos sorotipos de EIEC.

As quimiocinas recrutam diferentes populações de células para o local da inflamação e tem um importante papel tanto inicio como na manutenção da resposta inflamatória do hospedeiro (YANG *et al*., 1997). Dentre elas, a quimiocina IL-8 é muito importante, uma vez que ela apresenta um envolvimento na condução da resposta inflamatória, o que é crucial para o estabelecimento ou não da doença. Esta quimiocina é sintetizada pelas células epiteliais e é responsável por uma resposta inflamatória exacerbada e pela destruição tecidual, necessária para a eliminação do micro-organismo intracelular (SANSONETTI *et al.,* 1999).

Em nosso laboratório foi demonstrado que os níveis de secreção de IL-8 em célula infectadas com *S. flexneri* após 6 horas de infecção foi maior quando comparado com as células infectadas com EIEC sorotipo O124:H (MORENO *et al*., 2009). No presente trabalho, os diferentes sorotipos de EIEC foram analisados quanto ao nível de expressão de IL-8 e foi observado que após 6 horas de infecção em células Caco-2 a produção de IL-8 foi maior para os sorotipos O29:H^-, O143:H^-, O152:H^- e O167:H^- quando comparados com o sorotipo O124:H^-. Estes resultados corroboram com a participação das proteínas OspC1 e OspF na produção da quimiocina IL-8.

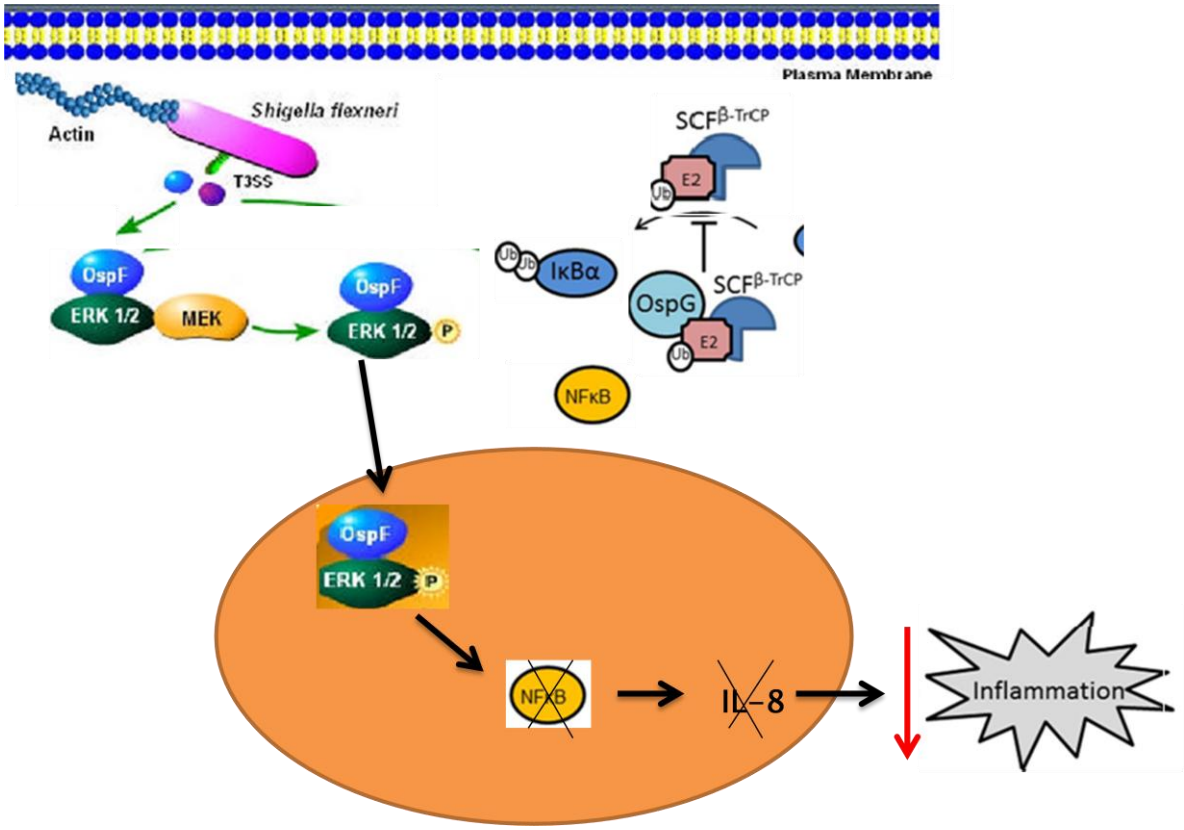


Figura 13: Representação esquemática da infecção com *S. flexneri* em células epiteliais intestinais e ativação das proteínas efetoras OspF e OspG (SCHROEDER *et al.,* 2008; ZURAWSKI *et al*., 2009).

Como é possível visualizar, a resposta imune de EIEC é complexa e dependente de diferentes mecanismos, alguns conhecidos e alguns provavelmente ainda desconhecidos. Os resultados obtidos neste estudo, em conjunto com os demais realizados pelo nosso grupo, podem elucidar algumas diferenças na resposta imune entre EIEC e *S. flexneri*. Porém, acreditamos que mais estudos como análise por Microarray da transcrição dos genes envolvidos nas vias de sinalização da cascata de proteínas das células epiteliais, quando infectadas por EIEC.

6 CONCLUSÃO

- Foi evidenciada a presença dos genes *ospC1, ospF e ospG* em todos os sorotipos de EIEC avaliados;
- Os diferentes sorotipos de EIEC apresentaram grande similaridade nas sequências de aminoácidos das proteínas OspC1 e OspF quando comparadas com *S. flexneri* 5a;
- Existem diferenças entre os sorotipos de EIEC na eficiência de invasão de células intestinais;
- Existem diferenças entre os sorotipos de EIEC e *S. flexneri* quanto aos níveis de transcrição dos genes *ospC1, ospF* e *ospG* no curso da infecção das células intestinais estas diferenças parecem estar relacionadas com a produção de IL-8 e NF-kB*;*
- Os resultados acima sugerem que a doença mais branda e a resolução mais rápida da disenteria causada por EIEC provavelmente se deve à maior produção no início da infecção de OspC1, OspF e OspG, uma vez que essas proteínas estão envolvidas na sinalização da resposta imune inata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, M.T.G.; SILVA, R.M.; DONAIRE, L.M.; MOREIRA, L.E.; MARTINEZ, M.B. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. J. Pediatria, 74:291-298, 1998.

AMHAZ, J.M.K. Alterações na resposta imune inata e adaptativa induzidas por *Escherichia coli enteroinvasora* em modelo murino. São Paulo, 2007. 116p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ARBIBE, L.; KIM, D.W.; BATSCHE, E.; PEDRON, T.; MATEESCU, B.; MUCHARDT, C.; PARSOT, C.; SANSONETTI, P.J. Nat Immunol. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. Nature. 8(1):47-56, 2007

ASHIDA, H., KIM, M., SCHMIDT-SUPPRIAN, M., MA, A., OGAWA, M., SASAKAWA., C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/Ikky to dampen the host NF-kB mediated inflammatory response. Nat. Cell. Biol. 12(1):66-9, 2010.

BANDO, S.Y.; MORENO, A.C.R.; ALBUQUERQUE, J.A.T.; AMHAZ, J.M.K.; MOUREIRA-FILHO, C.A.; MARTINEZ, M.B. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. Mem Inst Oswaldo Cruz, 105(6):001-006, 2010.

BANDO, S.Y.; VALLE G.R.F.; MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R.; MOUREIRA-FILHO, C.A.; MARTINEZ, M.B. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. FEMS Microbiol. Lett., 165:159-165, 1998.

BERNARDINI, M.L.; MOUNIER, J.; D'HAUTEVILLE, H.; COQUIS-RONDON, M., SANSONETTI, P.J. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proceedings

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.86, p.3867-3871, 1989.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. Nature, 430: 257-263, 2004.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D.S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKI, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science, 303:1532-1535, 2004.

BUCHRIESER, C. The virulence plasmid pWR100 and the repertore of proteins secreted by the type III secretion apparatus of Shigella flexneri*. Molecular Microbiology, v.38,* p.760-771, 2000.

CABRAL, J.P. Water microbiology: Bacterial pathogens and water. Int J Environ Res Public Health., v. 7, p. 3657-703, 2010.

CHATERJEE, B.D., SANYAL, S.N. Is it all shigellosis? *Lancet,* v. 2, p. 574, 1984.

COSSART, P.; SANSONETTI, P.J. Bacterial invasion: the paradigm of enteroinvasive pathogens. Science, v.304, p.242-248, 2004.

DONNENBERG, M.S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature, 406:768-774, 2000.

DORMAN, C.J.; MCKENNA, S.; BELOIN, C. Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri,* a facultative intracellular pathogen. International Journal of Medical Microbiology, v.291, p.89–96, 2001.

DRASAR, B.S.; HILL, M.J., eds. Human intestinal flora: the distribuition of bacterial flora in the intestine. London: Academic Press, 1974. v.36, p.36-43.

DUPONT, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; LIBONATI, J.P.; SHEHAN, D.G.; LABREC, E.H.; KALAS, J.P. Phatogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. New England Journal of Medicine, v.285, p.1-9, 1971.

ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O.; SERICHANTALERGS, O.; LEXOMBOON, U.; TAMURA, K. *Shigella* and enteroinvasive Escherichia coli infections in households of children with dysentery in Bangkok. J. Infect. Dis., 165:144-147, 1992

ELEWAUT, D.; DIDONATO, J.A.; KIM, J.M.; TRUONG, F.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. Journal of Immunology, v.3, p.1457-1466,1999.

EWING, W.H. Edward's and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed., Elsevier Science, New York, p.135-172, 1986.

EWING, W.H.; GRAVATTI, J.L. *Shigella* types encountered in the Mediterranean area. Journal of Bacteriology, v.53, p.191-195, 1947.

FDA - Food and Drug Administration. Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). Available online: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodborne PathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071298.htm> (Acessado em 22/09/2011).

FERREIRA, L.G. Caracterização da resposta inflamatória induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri* em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2. São Paulo, 2008. 78p. Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GAY, N.J., KEITH, F.J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature, 351(6325):355-6, 1991.

GUICHON, A., HERSH, D., SMITH, M.R., ZYCHLINSKY, A. Struture-function analyses of the *Shigella* virulence factor Ipa B. J. Bacterial., 183:1269-1276, 2001.

GUTH, B.E.C.; SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F.; LIMA, T.M.O.; TRABULSI, L.R. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *Escherichia coli* serogroup O29. J. Clin. Microbil., 27:2161-2164, 1989.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 97/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., v. 41, p. 95-98, 1999.

HILBI, H., MOSS, J.E., HERSH, D., CHEN, Y., ARONDEL, J., BANERJEE, S., FLAVELL, R.A., YUAN, J., SANSONETTI, P.J., ZYCHLINSKY, A. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. J. Biol. Chem., 49:32895-900, 1998.

INOHARA, N., CHAMAILLARD, M., MCDONALD, C., NUNEZ, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu Rev Biochem. 74:355-83, 2005.

JUNG, H.C.; ECKMANN, L.; YANG, S.K.; PANJA, A.; FIERRER, J.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. Journal of Clinical Investigation, v.95, n.1, p.55-65, 1995.

KAIN, K.C., BARTELUK, R.L., KELLY, M.T., XIN, H., De HUA, G., YUAN, G., PROCTOR, E.M., BYRNE, S., STIVER., H.G. Etiology of childhood diarrhea in Beijing China. *J. Microbiol*., v. 29, p. 90-95, 1991.

KANNEGANTI, T.D., LAMKAFI, M., KIM, Y.G., CHEN, G., PARK, J.H., FRANCHI, L., VANDENABEELE, P., NÚÑEZ, G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. Immunity. 26(4):433-43,2007.

KASPER, C.A., SORG, I., SCHMUTZ,C., TSCHON, T., WISCHNEWSKI, H., KIM, M.L., ARRIEUMERLOU, C. Cell-Cell Propagation of NF-kB Transcription factor and MAP Kinase activation amplifies innate immunity against bacterial infection. Cell Immunit. v 33, 804-816,2010.

KATOULI, M., JAARI, A., MOGHADDAM, A.A.F., KETABI, G.R. Etiological studies of diarrheal diseases in infants and young children in Iran. *J. Trop. Med. Med. Hyg,* v. 93, p. 22-27, 1990.

KIM, D.W.; CHU, H.; JOO, D.H.; JANG, M.S.; CHOI, J.H.; PARK, S.M.; CHOI, Y.J.; HAN, S.H.; YUN, C.H. OspF directly attenuates the activity of extracellular signal-regulated kinase during invasion by *Shigella flexneri* in human dendritic cell. Molecular Immunology, v.45, n.11, p.3295-3301, 2008.

KOTLOFF, K.L., WINICKOFF, J.P., IVANOFF, B., CLEMENS, J.D., SWERDLOW, D.L., SANSONETTI, P.J., ADAK, G.K., LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella*

infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organization, 77:651-666, 1999.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropatogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroaherent. *Journal of Infectious Diseases*, v.155, p.377-389, 1987.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods.25(4):402-8,2001.

MAKINO, S.; SASAKAWA, C.; KAMATA, K.; KURATA, T.; YOSHIKAWA, M. A genetic determinat required for continuos reinfection of adjascent cells on large plasmid in *S. flexneri 2a. Cell*, 46:551-555, 1986.

MARIER, R.; WELLS, J.C.; SWANSON, R.C.; CALLAHAN, W.; MEHLMAN, I.J. An outbreak of enteropathogenic *E. coli* foofborne disease traced to imported cheese. Lancet, 1:1376-1378, 1973.

MATSUSHITA, S.; YAMADA, S.; KAI, A.; KUDOH, Y. Invasive strains of *Escherichia coli* belonging to serotype O121:NM. J. Clin. Microbiol., 31:3034-5, 1993.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune: impact on the adaptative immune response. Curr. Opin. Immunol., 9:4-9, 1997.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune Recognition: mechanisms and pathways. Immunological Reviews, 173:89-97, 2000.

MÉNARD, R.; DEHIO, C.; SANSONETTI, P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. Trends in Microbiology, v.4, n.6, p.220-226, 1996.

MÉNARD, R.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. Journal of Bacteriology, v.175, n.18, p.5899-5906, 1993.

MORENO, A.C., FERREIRA, L.G., MARTINEZ, M.B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. FEMS Microbiol Lett., v. 301, p. 156-163, 2009.

MORENO, A.C.R., FILHO, A.F., GOMES, T.A.T.G., RAMOS, S.T.S., MONTEMOR, L.P.G., TAVARES, V.C., FILHO, L.S., IRINO, K., MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergente diarrheal pathogens. *Elsevier*, v. 66, p. 50-27, 2010.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, v.11, p.142-201, 1998.

OGAWA, M., SUZUKI, T., TATSUNO, I., ABE, H., SASAKAWA, C. IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. Mol. Microbiol., v. 48, n. 4, p. 913-31, 2003.

OGAWA, M.; YOSHIMORI, T.; SUZUKI, T.; SAGARA, H.; MIZUSHIMA, N.; SASAKAWA, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. Science, 307:727-731, 2005.

OGUNSANYA, T.I.; ROTIMI, V.O.; ADENUGA, A. A study of etiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. J. Med. Microbiol., 40:10-14, 1994.

OLIVEIRA, M.G., PESSOA, G.V.A., NAKAHARA, L.K. Enteropathogenic bacteria occurrence in diarrheic children living in Juiz de Fora municipality Minas Gerais. Inst. Adolfo Lutz, v. 49, p. 161-168, 1989.

ORLANDI, P.P., MAGALHAES, G.F., MATOS, N.B., SILVA, T., PENATTI, M., NOGUEIRA, P.A., SILVA, L.H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). Braz. J. Med. Biol. Res*.,* v. 39, p. 507–517, 2006.

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHAES, G.F., ALVES, F., CUNHA, R.P.A.C., DURLACHER, R., SILVA, L.H.P. Enteropathogenos Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, p. 621-625, 2001.

ORSKOV, I.; WACHSMUTH, K.; TAYLOR, D.N. Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from 'shiga-like' toxin II-producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). APMIS, 99:30-32, 1991.

PACHECO-GIL, L., OCHOA, T.J., FLORES-ROMO, L., DUPONT, H.L., ESTRADA-GARCIA, T. Enteroinvasive *Escherichia coli* severe dysentery complicated by rotavirus gastroenteritis. J. Infect., v. 53, p. 211-213, 2006.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiology Letters, v.252, p.11-88, 2005.

PARSOT, C., SANSONETTI, P.J. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 209:25-42,1996.

PÉDRON, T.; THIBAULT, C.; SANSONETTI, P.J. The invasive phenotype of Shigella flexneri directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. Journal of Biological Chemistry, v.278, p.33876-33886, 2003.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survivel? Immunology and Cell Biology, v.85, p.119-129, 2007.

PRATS, G.; LLOVET, T. Enteroinvasive *Escherichia coli*: Pathogenic mechanisms and epidemiology. Microbiologia, 11:91-96, 1995.

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

RATHMAN, M.; JOUIRHI, N.; ALLAOUI, A.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C.; TRAN VAN NHIEU, G. The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants those are deficient in intercellular spread. Molecular Microbiology, v.35, p.974-990, 2000.

REGUA-MANGIA, A.H., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M, ANDRADE, J.R.C., IRINO, K., TEIXEIRA, L.M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli*

strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Infection, v. 48, p.161-167, 2004.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. Gastroenterology, 122, n.4, p.1070-1087, 2002.

ROLLAND, C., DANCHIN, E., de FRAIPONT, M. The evolution of coloniality in birds in relation to food, habitat, predation, and life-history traits: a comparative analysis. The American naturalist. 151(6):514-29,1998.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; SAITO, M. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. Jap. J. Med. *Sci. Biol.,* 20:387-399, 1967.

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

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

SANSONETTI, P.J., ARONDEL, J., HUERRE, M., HARADA, A., MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. Infect. Immun., 3:1471-80, 1999.

SANSONETTI, P.J.; D'HAUTEVILLE, H.; FORMAL, S.B.; TOUCAS, M. Plasmid–mediated invasiveness of "*Shigella*-like" *Escherichia coli*. Annales de Microbiologie, v.133, n.3, p.351-355, 1982b.

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

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

SASAKAWA, C.; KOMATSU, K.; TOBE, T.; SUZUKI, T.; YOSHIKAWA, M. Eight genes in region 5 that form an operon are essencial for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri 2a.* J. bacterial., 182:2416-1421, 1993.

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

SERÉNY, B. Biochemical reactions and virulence of *E. coli* O124, K27 (B17). Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, v.10, p.11-18, 1963.

SERÉNY, B. Experimental keratoconjuctivitis shigellosa. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 4:367-376, 1957.

SILVA, R.M., TOLEDO, M.R.F., TRABULSI, L.R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., v. 11, p. 441-444, 1980.

TAMURA, K.; SAKAZAKI, R.; MURASE, M.; KOSAKO, Y. Serotyping and categorization of Escherichia coli strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. J. Med. Microbiol, 45:353-358, 1996.

TAYLOR, D.N.; ESCHEVERRIA, P.;. PAL, T.; SETHABUTR, O.; ROWE, B.; CROSS, J. The role of *Shigella sp*, enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. J. infect. Dis., 153:1132-1138, 1986.

TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. New invasive *Escherichia coli* strain. J. Clin. Microbiol., 11:422-423, 1980.

TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls, in São Paulo, SP, Brazil. Rev. Microbiol., 21:1-4, 1990.

TRABULSI, L.R., FERNANDES, M.R.F. Antigenic identity of culture 193T-64 and *E. coli* O136:K78 (B22). Rev. Inst. Med. Trop., 11:101-103, 1969.

TRABULSI, L.R.; FERNANDES, M.R.F.; ZULIANI, M.E. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. Rev. Inst. Med. Trop., 9:31-39, 1967.

TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E.; SERRANO, J.A. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.7, p.241-246, 1965.

VALENTINI, S.R.; GOMES, T.A.T.; FALCAO, D.P. Lack of virulence factors in *Escherichia coli* strains of enteropathogenic serougroups isolated from water. Appl. Envir. Microbiol., 58:412-414, 1992.

VAN DEN BELD, M.J.C.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11:1395-7, 2011.

VENKATESAN, N.M.; BUYSSE, J.M. Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen gene *ipaA* from *Shigella flexneri 5a*. Nucleic Acids Res., 18:1648, 1990.

VIEIRA, N., BATES, S.J., SOLBERG, O.D., PONCE, K., HOWSMON, R., CEVALLOS, W., TRUEBA, G., RILEY, L., EISENBERG, J.N. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg., 76(3):528-33, 2007.

WEI, P., WONG, W.W., PARK, J.S., CORCORAN, E.E., PEISAJOVICH, S.G., ONUFFER, J.J., WEISS, A., LIM, W.A. Bacterial virulence proteins as tools rewire kinase pathaways in yeast and immune cells. Nature. 488: 384-390, 2012.

YANG, S., ECKMANN, L., PANJA, A., KAGNOFF, M.F. Differential and regulated expression of C-X-X, C-C and C-chemokines by human colon ephitelial cells. Gastroenterology, 113:1214-1223, 1997.

ZURAWSKI, D.V.; MITSUHATA, C.; MUMY, K.L.; McCORMICK, B.A.; MAURELLI, A.T. OspF and OspC1 are shigella flexneri type III secretion system effectors that are

required for postinvasion aspects of virulence. Infection and Imunity, v.74, p.5964-5976, 2006.

ZURAWSKI, D.V.; MUMY, K.L.; FAHERTY, C.S.; McCORMICK, B.A.; MAURELLI, A.T. *Shigella flexneri* T3SS effectores OspB and OspF target the nucleus to dow-regulate the host inflammatory response via interactions with retinoblastoma protein. Mol. Microbiol. 71(2): 350-368, 2009.

ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M.C., SANSONETTI, P.J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. Nature, 358:167-9, 1992.

ZYCHLINSKY, A., THIRUMALAI, K., ARONDEL, J., CANTEY. J,R,, ALIPRANTIS. A,O,, SANSONETTI. P,J. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. Infect. Immun., 64:5357-65, 1996.

ANEXOS

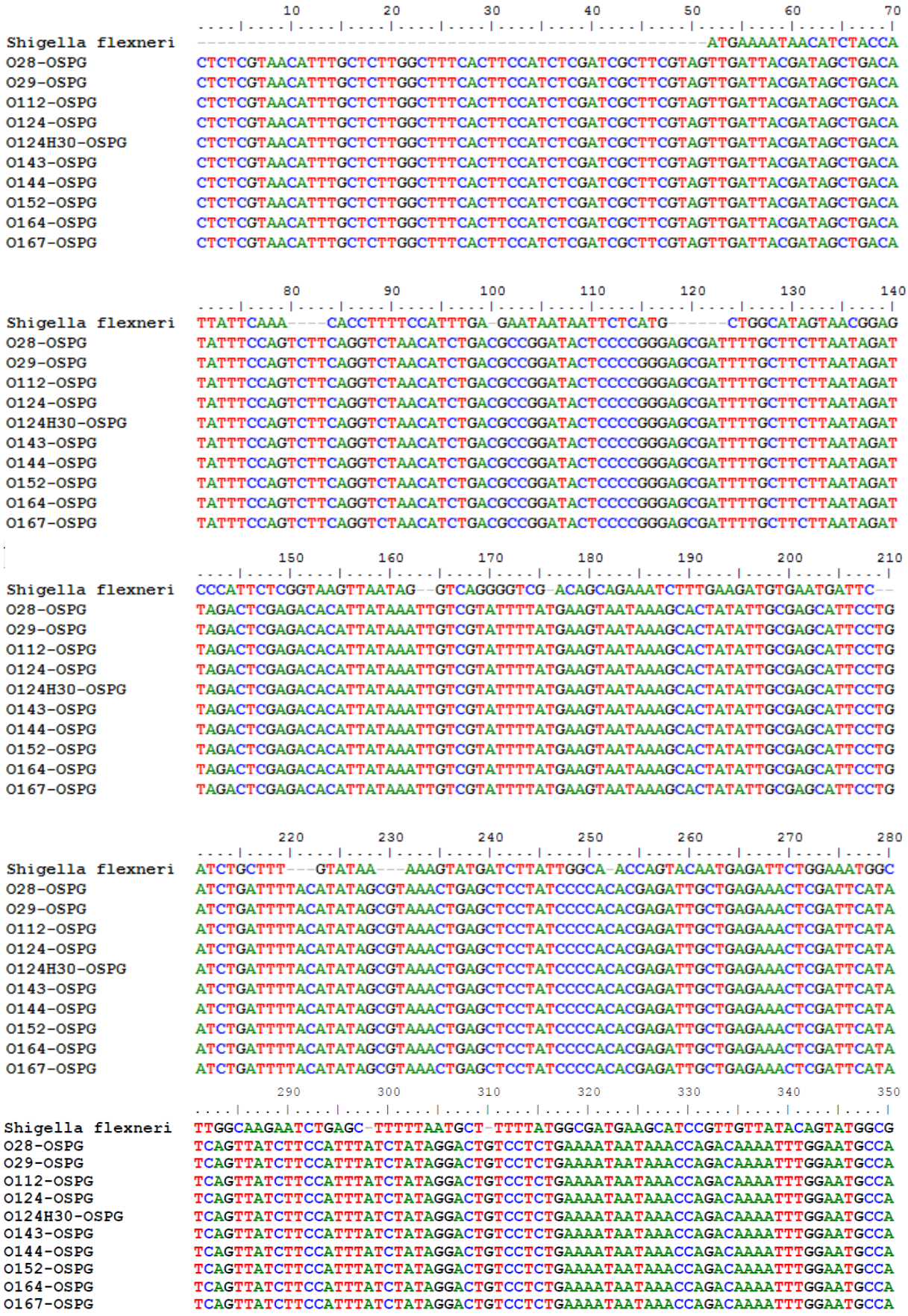
ANEXO A – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospC1*

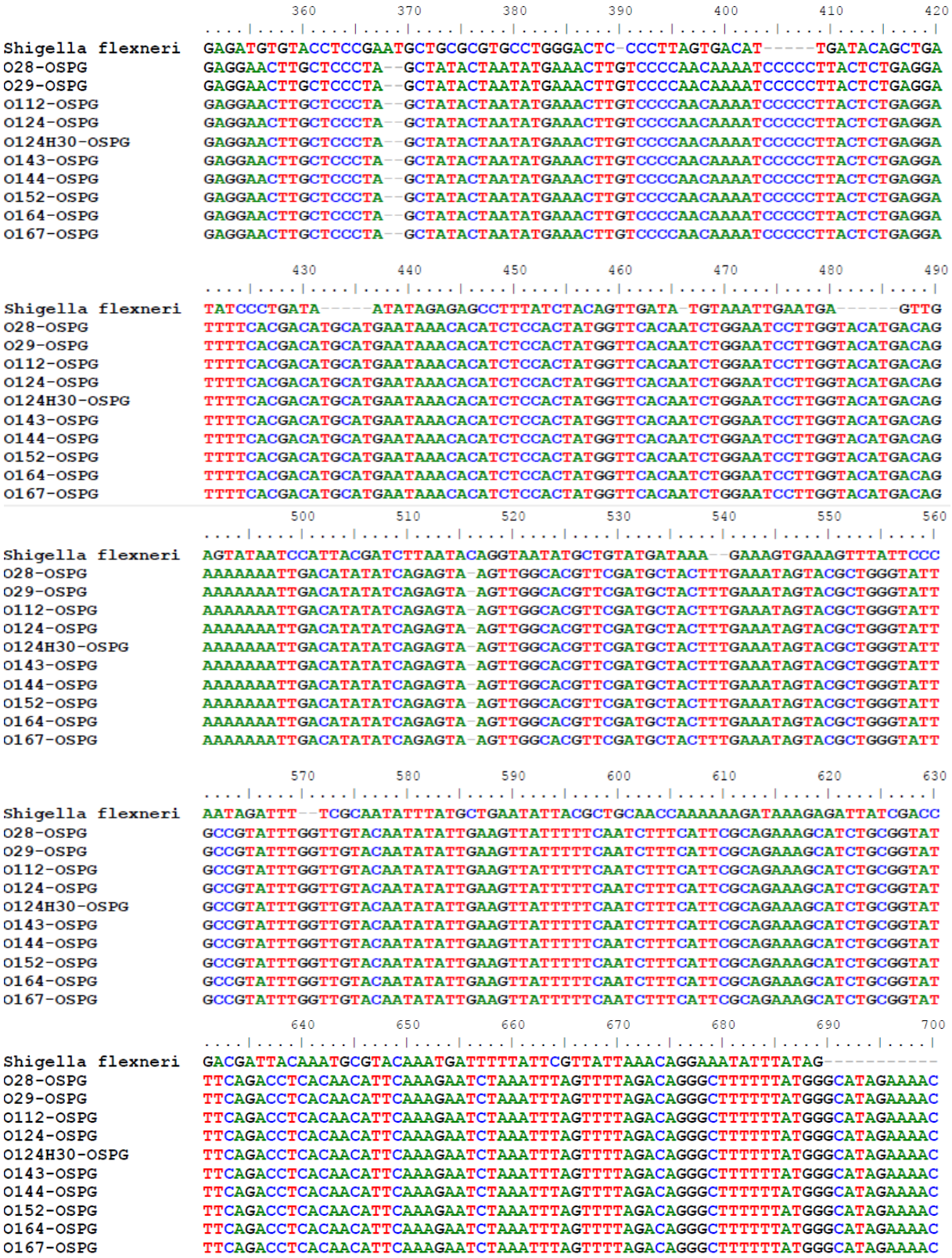
```
                ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                     5          15         25         35         45         55
O29 ospC1       AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O112 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O124 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O124H30 os      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O136 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O143 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O144 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O152 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O164 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
O167 ospC1      AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT
M90T            AAACAAAGTT TATGATTCTA TCCAGATCCA CAGGGGCAAG ATTTTTTCCA TAGCAAAACT

                ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                     65         75         85         95         105        115
O29 ospC1       CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O112 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O124 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O124H30 os      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O136 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O143 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O144 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O152 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O164 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
O167 ospC1      CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA
M90T            CCTTGAAGCT TTGGTCTTCA CTTTTTCTAA TAAAGTCAAT CAGGTATAAT CCGAGCCCTA

                ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                    125        135        145        155        165        175
O29 ospC1       ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O112 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O124 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O124H30 os      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O136 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O143 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O144 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O152 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O164 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
O167 ospC1      ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT
M90T            ACTTCATATC TTTAGTATTG AATATTGGTA CATCTATAAT TCCTTTACTT CCATGTACGT

                ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                    185        195        205        215        225        235
O29 ospC1       ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O112 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O124 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O124H30 os      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O136 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O143 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O144 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O152 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O164 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
O167 ospC1      ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
M90T            ATCGACTAAC TTCTTTATTA ACCTCTGAAA ATTTATCTAA AAATGATTGG TGCTCATGGT
```

```
                ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....
                   245        255        265        275        285        295
O29 ospC1       AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O112 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O124 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O124H30 os      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O136 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O143 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O144 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O152 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O164 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
O167 ospC1      AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG
M90T            AAAAAACAGG TGGAATAGCA TTATCAAAGT GATCGGTTAA TGTCATATAT CCATATGGAG

                ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....
                   305        315        325        335        345        355
O29 ospC1       AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O112 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O124 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O124H30 os      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O136 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O143 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O144 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O152 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O164 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
O167 ospC1      AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA
M90T            AGTCATGATC AATGATATAC GCATTTGCAC CAAAATCAAC AGTGTGATGT TTTGTATTCA

                ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....
                   365        375        385        395        405        415
O29 ospC1       GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O112 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O124 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O124H30 os      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O136 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O143 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O144 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O152 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O164 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
O167 ospC1      GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG
M90T            GGGGGTGTTT TTTCTGATGG CTAGAGATTT CAACGCCAAA AAACACAAAG TCATGATTAG

                ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....
                   425        435        445        455        465        475
O29 ospC1       CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O112 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O124 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O124H30 os      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O136 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O143 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O144 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O152 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O164 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
O167 ospC1      CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA
M90T            CTATTTTTTT TATATCATCA GCGTATGTGT TTCGTTTTGT GCATATTCCT TCAGACTGAA

                ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....  ....|....
                   485        495        505        515        525        535
O29 ospC1       TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O112 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O124 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O124H30 os      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O136 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O143 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O144 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O152 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O164 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
O167 ospC1      TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
M90T            TTTTATTGAA TGACTTAATG TTTAAAATTT TATCAGACAA ATCAGAATTA CTTTGATGTC
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....
                   545        555        565
O29 ospC1       TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O112 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O124 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O124H30 os      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O136 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O143 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O144 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O152 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O164 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
O167 ospC1      TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
M90T            TGAAGATTAA ATCAGAATTA ATAATTAGC
```

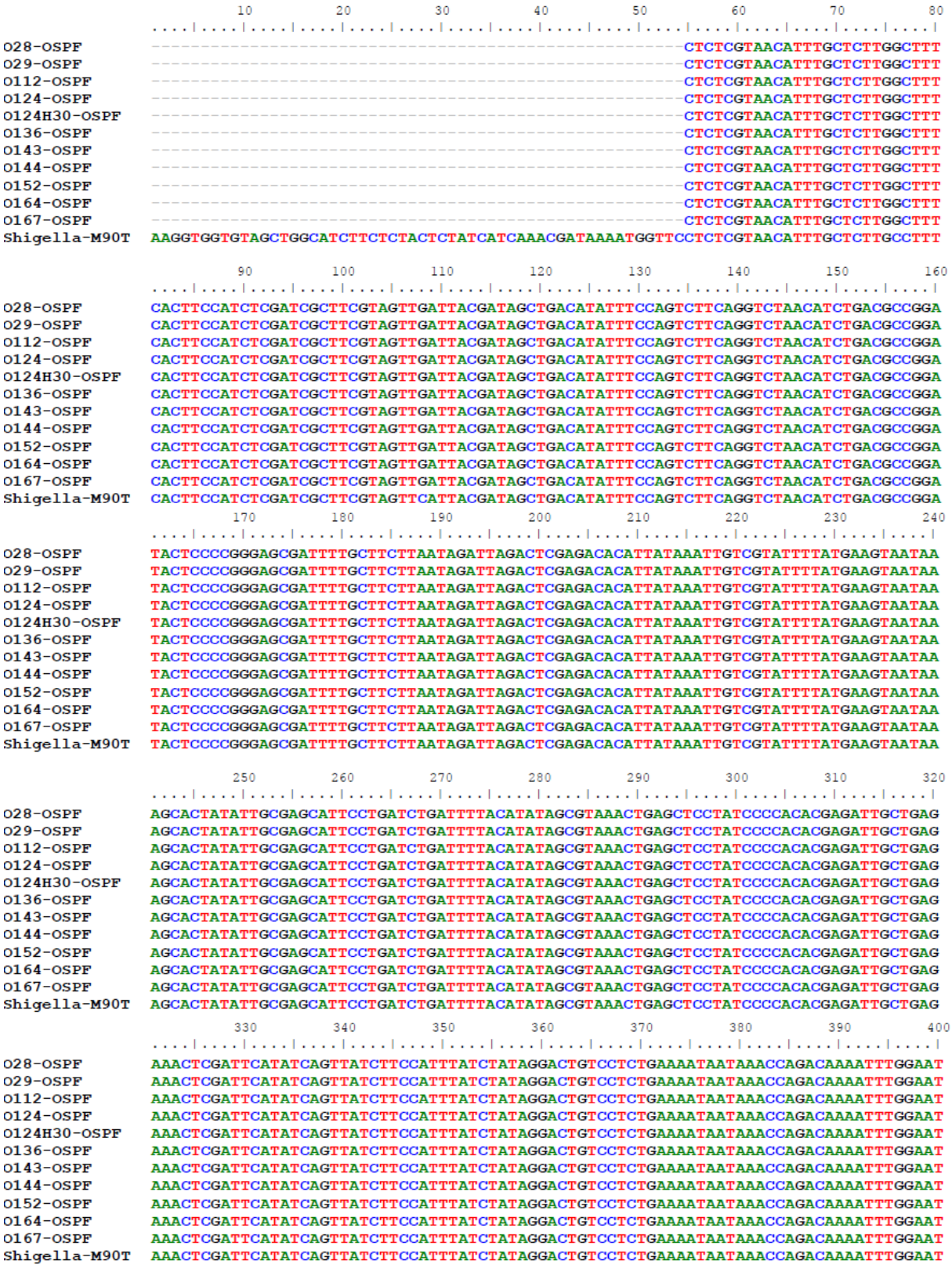
ANEXO B – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospG*

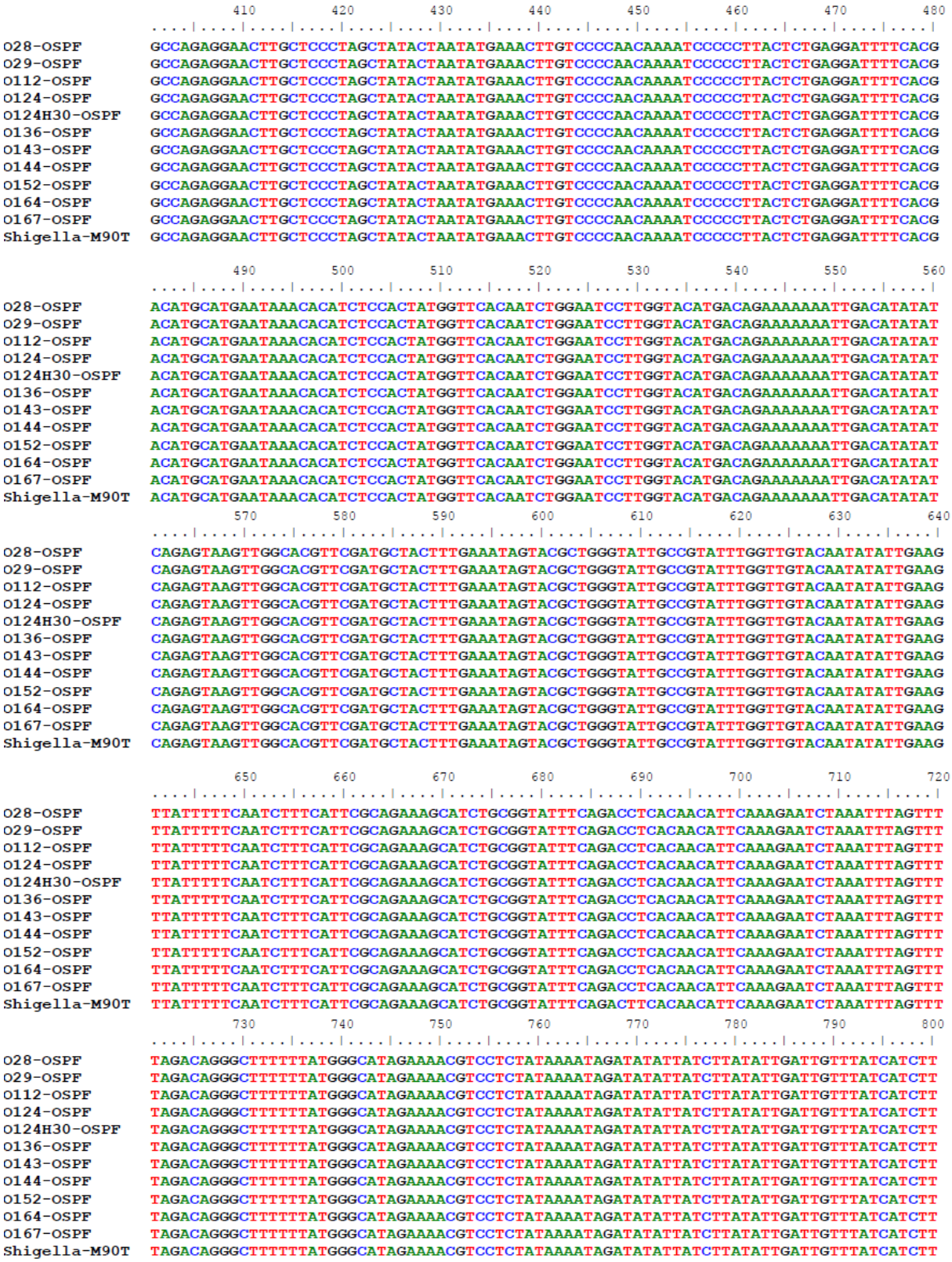


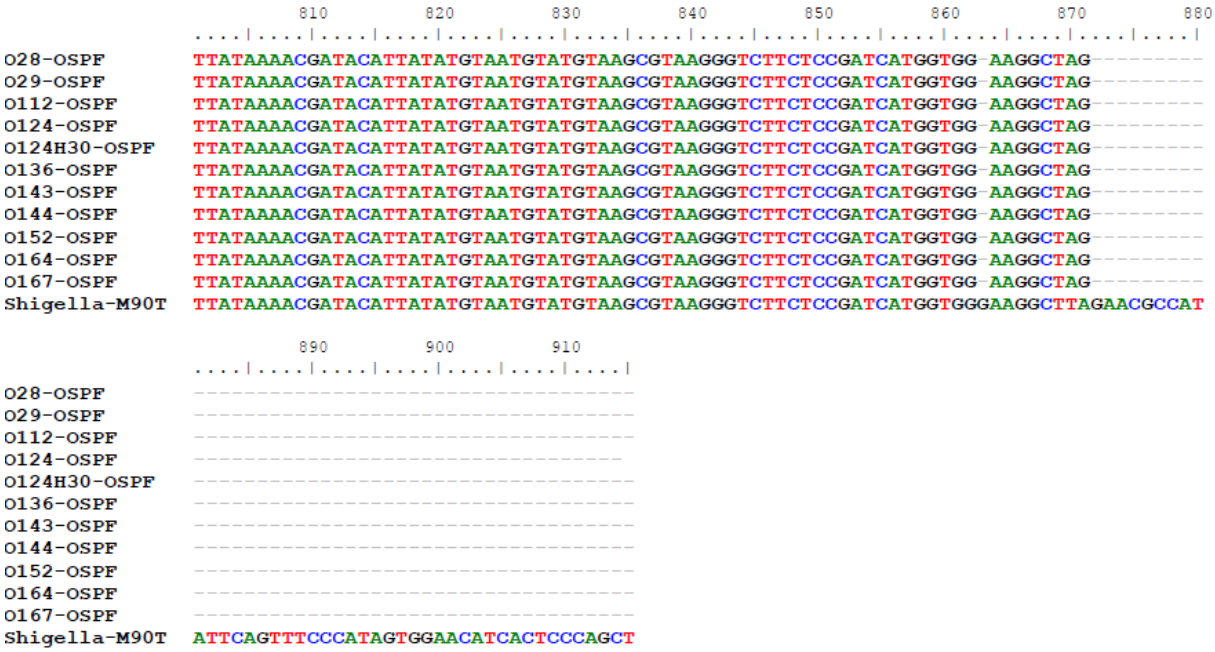

360 370 380 390 400 410 420
Shigella flexneri GAGATGTGTACCTCCGAATGCTGCGCGTGCCTGGGACTC-CCCTTAGTGACAT-----TGATACAGCTGA
O28-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O29-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O112-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O124-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O124H30-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O143-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O144-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O152-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O164-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
O167-OSPG GAGGAACTTGCTCCCTA--GCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGA
430 440 450 460 470 480 490
Shigella flexneri TATCCCTGATA-----ATATAGAGAGCCTTTATCTACAGTTGATA-TGTAAATTGAATGA------GTTG
O28-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O29-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O112-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O124-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O124H30-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O143-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O144-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O152-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O164-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
O167-OSPG TTTTCACGACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAG
500 510 520 530 540 550 560
Shigella flexneri AGTATAATCCATTACGATCTTAATACAGGTAATATGCTGTATGATAAA--GAAAGTGAAAGTTTATTCCC
O28-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O29-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O112-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O124-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O124H30-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O143-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O144-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O152-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O164-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
O167-OSPG AAAAAAATTGACATATATCAGAGTA-AGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATT
570 580 590 600 610 620 630
Shigella flexneri AATAGATTT--TCGCAATATTTATGCTGAATATTACGCTGCAACCAAAAAAGATAAAGAGATTATCGACC
O28-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O29-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O112-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O124-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O124H30-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O143-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O144-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O152-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O164-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
O167-OSPG GCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAGTTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTAT
640 650 660 670 680 690 700
Shigella flexneri GACGATTACAAATGCGTACAAATGATTTTTATTCGTTATTAAACAGGAAATATTTATAG----------
O28-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O29-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O112-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O124-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O124H30-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O143-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O144-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O152-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O164-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC
O167-OSPG TTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTTTAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAAC

710 720 730 740 750 760 770
Shigella flexneri
O28-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O29-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O112-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O124-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O124H30-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O143-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O144-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O152-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O164-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
O167-OSPG GTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTTTTATAAAACGATACATTATAT
780 790 800 810
Shigella flexneri
O28-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O29-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O112-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O124-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O124H30-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O143-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O144-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O152-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O164-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG
O167-OSPG GTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGAAGGCTAG

ANEXO C – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *ospF*




410 420 430 440 450 460 470 480
O28-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O29-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O112-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O124-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O124H30-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O136-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O143-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O144-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O152-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O164-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
O167-OSPF GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
Shigella-M90T GCCAGAGGAACTTGCTCCCTAGCTATACTAATATGAAACTTGTCCCCAACAAAATCCCCCTTACTCTGAGGATTTTCACG
490 500 510 520 530 540 550 560
O28-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O29-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O112-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O124-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O124H30-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O136-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O143-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O144-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O152-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O164-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
O167-OSPF ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
Shigella-M90T ACATGCATGAATAAACACATCTCCACTATGGTTCACAATCTGGAATCCTTGGTACATGACAGAAAAAAATTGACATATAT
570 580 590 600 610 620 630 640
O28-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O29-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O112-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O124-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O124H30-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O136-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O143-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O144-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O152-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O164-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
O167-OSPF CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
Shigella-M90T CAGAGTAAGTTGGCACGTTCGATGCTACTTTGAAATAGTACGCTGGGTATTGCCGTATTTGGTTGTACAATATATTGAAG
650 660 670 680 690 700 710 720
O28-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O29-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O112-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O124-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O124H30-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O136-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O143-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O144-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O152-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O164-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
O167-OSPF TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACCTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
Shigella-M90T TTATTTTTCAATCTTTCATTCGCAGAAAGCATCTGCGGTATTTCAGACTTCACAACATTCAAAGAATCTAAATTTAGTTT
730 740 750 760 770 780 790 800
O28-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O29-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O112-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O124-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O124H30-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O136-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O143-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O144-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O152-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O164-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
O167-OSPF TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT
Shigella-M90T TAGACAGGGCTTTTTTATGGGCATAGAAAACGTCCTCTATAAAATAGATATATTATCTTATATTGATTGTTTATCATCTT


810 820 830 840 850 860 870 880
O28-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O29-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O112-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O124-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O124H30-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O136-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O143-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O144-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O152-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O164-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
O167-OSPF TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGG AAGGCTAG
Shigella-M90T TTATAAAACGATACATTATATGTAATGTATGTAAGCGTAAGGGTCTTCTCCGATCATGGTGGGAAGGCTTAGAACGCCAT
890 900 910
O28-OSPF
O29-OSPF
O112-OSPF
O124-OSPF
O124H30-OSPF
O136-OSPF
O143-OSPF
O144-OSPF
O152-OSPF
O164-OSPF
O167-OSPF
Shigella-M90T ATTCAGTTTCCCATAGTGGAACATCACTCCCAGCT