



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil

Júlia Cunha Gonzales

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil

Júlia Cunha Gonzales

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientada: Júlia Cunha Gonzales

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Gonzales, Júlia Cunha

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil. Ribeirão Preto, 2022. 87 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientador: Falcão, Juliana Pfrimer.

1. *Shigella flexneri* 2. Genes de virulência 3. Resistência a antimicrobianos 4. Tipagem molecular 5. Ensaios *in vitro* e *in vivo* de virulência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Júlia Cunha Gonzales

Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

À minha mãe Maria Regina, pois sem ela nada seria possível ou valeria a pena. Ao meu pai José Ronaldo, meu maior exemplo de vida, força, coragem e dignidade. Aos meus irmãos Tiago e Fernanda, que mesmo longe fisicamente se fazem presentes em todos os meus dias. À minha avó Nydia pelo amor e apoio incondicionais. Ao meu namorado Felipe por tornar tudo mais leve. Ao meu filho peludo Pedrão, que me ensinou o que é o verdadeiro companheirismo. Amo vocês com todo meu coração!

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, agradeço por me receber em seu laboratório, orientar-me e acreditar que eu poderia evoluir. Muito obrigada por tudo!

Ao pesquisador do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, Dr. Paulo da Silva, agradeço a preciosa colaboração e concessão das linhagens de *Shigella flexneri* provenientes do Estado de São Paulo, sem as quais a realização desse trabalho não seria possível;

A pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, muito obrigada pela concessão das linhagens de *Shigella flexneri* de diferentes Estados do Brasil, que foram muito importantes para enriquecer este estudo;

Ao Dr. Fábio Campioni, pós-doutorando do nosso laboratório na FCFRP-USP, agradeço a colaboração principalmente nos experimentos de MLST. Sua amizade, bom humor, paciência e energia positiva foram fundamentais para mim e para o andamento do projeto;

À Dra. Carolina Nogueira Gomes, pós-doutoranda do nosso laboratório na FCFRP-USP, agradeço a colaboração imprescindível nos experimentos com células humanas. Você é exemplo de perseverança e força. Muito obrigada por fazer parte do meu dia a dia;

Aos meus colegas de pós-graduação do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP: Dra. Amanda Seribelli, Felipe Vilela, Giovana Pereira e Dra. Miliane Frazão, obrigada por toda a ajuda, paciência e companhia em todos os dias de trabalho;

Aos técnicos Jaqueline Passaglia e Edson Alves Gomes, pela contribuição na realização deste trabalho;

À Adriana Aparecida Marques, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo auxílio e suporte no sequenciamento de genes para tipagem por MLST;

À Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress da FCFRP-USP, à técnica Ludmilla Tonani e ao Dr. Mário Henrique Paziani pelo auxílio e colaboração fundamental nos experimentos com modelo *in vivo Galleria mellonella*;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas;

À Rosana Florêncio, Henrique Teodoro e Ana Lúcia Turatti, funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e competência durante todo o andamento do doutorado;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 140227/2019);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão dos auxílios de pesquisa (Processo 2016/24716-3 e 2019/19338-8), bem como por todo o suporte financeiro concedido ao Laboratório;

A todos os meus amigos, Wisner Tahan, Júlia Corrêa, Marcelly Cunha, Mariane Neiva e Cícero Almeida pelo carinho, apoio, orações, ensinamentos e alegrias de uma vida;

A Deus, por me iluminar;

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Não sei quantas almas tenho

Não sei quantas almas tenho.

Cada momento mudei.

Continuamente me estranho.

Nunca me vi nem acabei.

De tanto ser, só tenho alma.

Quem tem alma não tem calma.

Quem vê é só o que vê,

Quem sente não é quem é,

Atento ao que sou e vejo,

Torno-me eles e não eu.

Cada meu sonho ou desejo

É do que nasce e não meu.

Sou minha própria paisagem;

Assisto à minha passagem,

Diverso, móbil e só,

Não sei sentir-me onde estou.

Por isso, alheio, vou lendo

Como páginas, meu ser.

O que segue não prevendo,

O que passou a esquecer.

Noto à margem do que li

O que julguei que senti.

Releio e digo: “Fui eu”

Deus sabe, porque o escreveu.

Fernando Pessoa

RESUMO

GONZALES, J. C. **Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella flexneri* isoladas por 34 anos em diferentes Estados do Brasil.** 2022. 87f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A shigelose ou disenteria bacilar é causada por bactérias do gênero *Shigella* spp., e é um grave problema de saúde pública em vários locais do mundo. Em países em desenvolvimento como o Brasil, a shigelose é causada principalmente pela espécie *Shigella flexneri*. No entanto, existem relativamente poucos estudos que caracterizaram molecularmente linhagens de *S. flexneri* isoladas no país. O objetivo desse estudo foi caracterizar molecularmente e fenotipicamente 130 linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes de humanos com gastroenterite, entre os anos de 1983 a 2017 em diferentes Estados do Brasil. A pesquisa do potencial patogênico das linhagens de *S. flexneri* estudadas foi realizada pela pesquisa de 16 importantes genes de virulência por PCR convencional para as 130 linhagens de *S. flexneri*; pela capacidade de 50 linhagens selecionadas de invadir e sobreviver em células epiteliais do intestino humano (Caco-2), bem como sobreviver e se multiplicar em macrófagos de humanos (U-937). Adicionalmente, foi realizada a avaliação da virulência de 8 linhagens selecionadas de *S. flexneri* em *Galleria mellonella*. O perfil de resistência antimicrobiana foi obtido pela técnica de disco difusão para todas as linhagens. A caracterização da diversidade genotípica das 130 linhagens foi verificada por *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e *Multi-locus Sequence Typing* (MLST). Uma alta frequência de alguns genes de virulência foi observada, o gene *ipaH* foi encontrado em todas as linhagens; os genes *ial*, *sigA*, *iuc*, *virA* e *pic* foram encontrados em mais de 70% das linhagens. Os genes *sat* e *virF* foram encontrados em 48,5% e 57,7% das linhagens, respectivamente. Os genes *ipgD*, *icsA*, *virB*, *sepA*, *set1B*, *set1A* e *sen* foram encontrados em menos de 40% das linhagens estudadas. A porcentagem de invasão em células Caco-2 foi $\geq 40\%$ e a sobrevivência em U-937 foi $\geq 60\%$ para as linhagens de *S. flexneri* analisadas. Sete das oito linhagens de *S. flexneri* estudadas causaram a morte de mais de 50% das larvas de *Galleria mellonella* após 10 dias de experimento. Um total de 57 (43,8%) linhagens foram multidroga resistentes (MDR). Por ERIC-PCR um total de 96 (73,8%) linhagens foram agrupadas em um único grupo com $\geq 70,4\%$ de similaridade genética e especificamente 75 dessas linhagens apresentaram similaridade genética $\geq 80,9\%$. Por PFGE um total de 120 (92,3%) linhagens

foram agrupadas em um único grupo com 57,4% de similaridade genética, e, especificamente 82 dessas linhagens apresentaram similaridade genética $\geq 70,6\%$. Todas as linhagens foram tipadas como ST245 por MLST. Em conclusão, a alta frequência de importantes genes de virulência, a grande porcentagem de invasão e sobrevivência das linhagens em células Caco-2 e em U-937 e a alta mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* evidenciaram o potencial patogênico das linhagens de *S. flexneri* estudadas. As altas taxas de linhagens MDR são alarmantes, pois podem levar a ineficácia terapêutica quando o tratamento é necessário. Os resultados de ERIC-PCR, PFGE e MLST sugeriram a presença de linhagens descendentes de um subtipo prevalente de *S. flexneri* circulando em diferentes Estados do Brasil.

Palavras-chave: *Shigella flexneri*; genes de virulência; resistência a antimicrobianos; tipagem molecular, ensaios *in vitro* e *in vivo* de virulência.

ABSTRACT

GONZALES, J. C. Analysis of pathogenic potential, genotypic diversity and resistance profile of *Shigella flexneri* strains isolated over 34 years in different States of Brazil. 2022. 87f. Thesis (Doctorate). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Shigellosis or bacillary dysentery is caused by bacteria of the genus *Shigella* spp., and it is a serious public health problem in several places around the world. In developing countries like Brazil, shigellosis is mainly caused by the *Shigella flexneri* species. However, there are relatively few studies that molecularly characterized *S. flexneri* strains isolated in this country. The objective of this study was to molecularly and phenotypically characterize 130 *S. flexneri* strains isolated from feces of humans with gastroenteritis, from 1983 to 2017 in different States of Brazil. The investigation of the pathogenic potential of the studied *S. flexneri* strains was carried out by searching 16 important virulence genes by conventional PCR for 130 *S. flexneri* strains; by the ability of 50 selected strains to invade and survive in human gut epithelial cells (Caco-2), as well as to survive and multiply in human macrophages (U-937). Additionally, the virulence of 8 selected *S. flexneri* strains was evaluated in *Galleria mellonella* model. Antimicrobial resistance profiles were obtained using the disk diffusion technique for all strains. The characterization of the genotypic diversity of the 130 strains was verified by *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) and *Multi-locus Sequence Typing* (MLST). A high frequency of some virulence genes was observed, the *ipaH* gene was found in all strains; *ial*, *sigA*, *iuc*, *virA* and *pic* genes were found in more than 70% of the strains. The *sat* and *virF* genes were found in 48.5% and 57.7% of the strains, respectively. The *ipgD*, *icsA*, *virB*, *sepA*, *set1B*, *set1A* and *sen* genes were found in less than 40% of the studied strains. The percentage of invasion in Caco-2 cells was $\geq 40\%$ and survival in U-937 was $\geq 60\%$ for the analyzed *S. flexneri* strains. Seven of the eight *S. flexneri* strains studied caused the death of more than 50% of the *Galleria mellonella* larvae after 10 days of the assay. A total of 57 (43.8%) strains were multidrug resistant (MDR). By ERIC-PCR a total of 96 (73.8%) strains were grouped into a single cluster with $\geq 70.4\%$ of genetic similarity and, specifically 75 of these strains presented a genetic similarity $\geq 80.9\%$. By PFGE a total of 120 (92.3%) strains were grouped into a single cluster with 57.4% of genetic similarity and, specifically 82 of these strains showed a genetic similarity $\geq 70.6\%$. All strains were typed as ST245 by MLST. In conclusion, the high frequency of important virulence genes,

the high percentage of invasion and survival of the strains in Caco-2 and U-937 cells and the high mortality of *Galleria mellonella* larvae highlighted the pathogenic potential of the *S. flexneri* strains studied. The high rates of MDR strains are alarming, as it can lead to therapeutic failure when treatment is necessary. The results of ERIC-PCR, PFGE and MLST suggested the presence of strains descending from a prevalent subtype of *S. flexneri* circulating in different States of Brazil.

Keywords: *Shigella flexneri*; virulence genes; antimicrobial resistance; molecular typing, *in vitro* and *in vivo* virulence assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo molecular de patogênese de <i>Shigella</i> spp.....	08
Figura 2. Porcentagem de invasão e sobrevivência das 50 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> analisadas e da linhagem referência <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 em células epiteliais Caco-2.....	36
Figura 3. Porcentagem de sobrevivência das 50 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> analisadas e da linhagem referência <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 em macrófagos humanos U-937.....	38
Figura 4. Análise de virulência de oito linhagens representativas de <i>Shigella flexneri</i> de diferentes décadas, Estados e com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos em larvas de <i>Galleria mellonella</i> ao longo de 10 dias.....	39
Figura 5. Frequência de 57 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> multidroga resistentes (MDR) estudadas por 34 anos.....	41
Figura 6. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de fragmentos obtidos pela técnica ERIC-PCR para as 130 linhagens <i>Shigella flexneri</i> estudadas.....	44
Figura 7. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de fragmentos obtidos pela técnica PFGE para as 130 linhagens <i>Shigella flexneri</i> estudadas.....	47
Figura 8. Alinhamento e análise de sequências do gene <i>adk</i> de uma linhagem representativa de <i>Shigella flexneri</i> pelo programa ChromasPro.....	48
Figura 9. Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa <i>GoEburst</i> com as 50 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> selecionadas desse estudo e 9.196 linhagens relacionadas depositadas no banco de dados até 03/10/2021. Todas as linhagens do presente estudo foram tipadas como ST245. Em verde estão os grupos <i>founders</i> (central de complexos clonais), em preto todos os outros STs do banco de dados.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes plasmidiais e cromossômicos pesquisados e suas respectivas funções.....	09
Tabela 2 – Anos e Estados das 130 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> estudadas isoladas de fezes diarreicas de humanos de 1983 a 2017 no Brasil.....	21
Tabela 3 – Sequência de <i>primers</i> , tamanho dos <i>amplicons</i> , temperatura de hibridação referências.....	23
Tabela 4 – Descrição dos reagentes utilizados na reação de ERIC-PCR	27
Tabela 5 – Dados gerais sobre os primers utilizados na amplificação dos genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica de <i>Multi-locus Sequence Typing</i> (MLST).....	31
Tabela 6 – Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos sete genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica do MLST.....	32
Tabela 7 – Frequência dos genes de virulência pesquisados em 130 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> estudadas.....	37
Tabela 8 – Frequência da resistência de 130 linhagens de <i>Shigella flexneri</i> estudadas a diferentes antimicrobianos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Cloranfenicol
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institutes</i>
CTX	Cefotaxima
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DI	Índice de discriminação
DLV	<i>Double locus variant</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
F	<i>Forward</i>
IAL-RP	Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto
Ipas	<i>Invasion Plasmid Antigens</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multidroga resistente
MLST	<i>Multi-locus sequence Typing</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
N/A	Não aplicável
NA	Ácido nalidíxico
NS	Não significativo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PRL	Piperacilina

q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	<i>Reverse</i>
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAM	Ampicilina-sulbactam
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHU	Síndrome hemolítico-urêmica
SLV	<i>Single locus variant</i>
spp.	Espécies
SPATEs	Toxinas autotransportadoras serina protease
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tetraciclina
Tris	Hidroximetilaminometano
TSA	<i>Tryptone Soya Agar</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS (opcional)

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

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
Lista de símbolos.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. História e taxonomia.....	1
1.2. Gênero <i>Shigella</i> spp.....	2
1.3. <i>Shigella flexneri</i>	3
1.4. Epidemiologia no mundo.....	4
1.5. Epidemiologia no Brasil.....	5
1.6. Transmissão, manifestações clínicas e patogênese.....	5
1.7. Genes de virulência.....	8
1.8. Ensaio <i>in vivo</i> com o modelo <i>Galleria mellonella</i>	10
1.9. Resistência a antimicrobianos.....	11
1.10. Métodos de tipagem molecular.....	12
1.10.1. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> PCR (ERIC-PCR).....	13
1.10.2. <i>Pulsed-field gel eletrophoresis</i> (PFGE).....	14
1.10.3. <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST).....	14
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Linhagens bacterianas.....	22
4.2. Detecção de genes de virulência por PCR convencional.....	23
4.3. Caracterização da capacidade de invasão e sobrevivência em células Caco-2.....	24
4.4. Caracterização da capacidade de sobrevivência e multiplicação em macrófagos U-937.....	25
4.5. Avaliação da virulência em <i>Galleria mellonella</i>	27
4.6. Determinação do perfil de resistência antimicrobiana por disco difusão.....	27

4.7. Tipagem molecular por ERIC-PCR.....	28
4.8. Tipagem molecular por PFGE	29
4.9. Índice de discriminação (DI)	31
4.10. Tipagem molecular por MLST	31
4.10.1. Amplificação dos genes <i>housekeeping</i>	32
4.10.2. Análise das sequências obtidas.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Genes de virulência.....	36
5.2. Ensaio de invasão e sobrevivência em células Caco-2.....	36
5.3. Ensaio de sobrevivência em macrófagos U-937.....	38
5.4. Ensaio de virulência em larvas <i>Galleria mellonella</i>	40
5.5. Resistência antimicrobiana.....	40
5.6. Tipagem molecular por ERIC-PCR.....	42
5.7. Tipagem molecular por PFGE.....	45
5.8. Índice de discriminação (DI).....	48
5.9. Tipagem molecular por MLST.....	48
5.9.1. Amplificação de genes <i>housekeeping</i>	48
5.9.2. Sequenciamento.....	48
5.9.3. Diagrama de similaridade genética gerado com os dados do MLST.....	49
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE(S).....	82

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 História e taxonomia

A disenteria bacilar ou shigelose é uma doença causada por bactérias do gênero *Shigella* spp. que tem sido reportada desde os tempos bíblicos. Hipócrates introduziu o termo disenteria (Δυσεντερία) (problemas intestinais) para descrever uma doença caracterizada pela excreção de fezes contendo sangue e muco acompanhadas por tenesmo (DAVISON, 1922; ZUMLA, 2010; LAMPEL et al., 2018).

O médico japonês Kiyoshi Shiga é creditado como o primeiro cientista a isolar e caracterizar bactérias do gênero *Shigella* spp. e o gênero carrega seu nome até os dias atuais (LAMPEL et al., 2018). No ano de 1896, Shiga isolou a bactéria de fezes diarreicas de 34 pacientes e da parede intestinal de dois pacientes pós-morte no Japão. Nessa época o Japão passava por uma grave epidemia de shigelose causada pela espécie *S. dysenteriae*, que contaminou mais de 91.000 pessoas e tinha uma taxa de mortalidade maior do que 20%; (TROFRA, 1999; HARDY & KOHLER, 2006).

Shiga caracterizou a disenteria bacilar como “a mais temida doença infantil”, devido ao seu curso fulminante e altos índices de mortalidade, e nomeou a espécie isolada de *Bacillus dysenteriae* (SHIGA, 1936). Atualmente, essa espécie é denominada *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 e possui um alto potencial patogênico devido a produção de uma enteroxina, conhecida como toxina de Shiga. Essa toxina é responsável por provocar graves patologias, como a colite hemorrágica, que pode evoluir para complicações extra intestinais graves, como a síndrome hemolítico-urêmica (SHU), progredindo para falência renal (RIVAS et al., 2006).

O gênero *Shigella* spp. foi expandido logo após a descoberta da espécie *Shigella flexneri*. Em 1899 Simon Flexner seguindo os métodos de Shiga cultivou microrganismos isolados de fezes de soldados do Exército dos EUA com disenteria. Flexner encontrou, porém, uma espécie diferente da isolada anteriormente pelo médico japonês. O novo microrganismo descoberto passou a ser conhecido como o Bacilo Flexner e atualmente é denominado *Shigella flexneri* (LAMPEL et al., 2018).

Estudos posteriores de Walther Kruse, que investigou um grande surto de disenteria no norte de Bonn, na Alemanha, também revelaram a presença de bacilos de *Shigella* spp. em fezes de pacientes (KRUSE, 1900). Em 1901, Kruse publicou um estudo com pacientes residentes de um asilo acometidos por disenteria (KRUSE, 1901). Esses estudos e subsequentes trabalhos da Grã-Bretanha demonstraram que a disenteria bacilar não era apenas uma doença comum nos trópicos e em guerras. Observou-se que a doença ocorria em locais com aglomerações humanas

e sem saneamento. Na Inglaterra, por exemplo, a shigelose ocorria principalmente em manicômios, o que fez com que a doença também fosse conhecida na época como “disenteria asilar” ou “colite de asilo” (LAMPEL et al., 2018).

Em 1915, Carl Sonne isolou um bacilo fermentador tardio de lactose (*S. dysenteriae* e *S. flexneri* não são fermentadores de lactose), assim ocorreu a descoberta da principal espécie causadora de disenteria na Dinamarca (SONNE, 1915). Sonne propôs que o novo bacilo fosse classificado como grupo III para distingui-lo do grupo I (*S. dysenteriae*) e grupo II (*S. flexneri*). Além disso, Sonne notou que a maioria dos casos de disenteria causada por essa nova espécie apresentava uma forma moderada de diarreia. Felix d'Herelle também encontrou esta espécie associada a casos de disenteria na França (D'HERELLE, 1916), assim como Theodor Thjotta na Noruega (THJØTTA, 1919).

Em 1929, Boyd realizou um estudo em Bangalore, Índia, que consistia em classificar e caracterizar linhagens que tinham as mesmas características de *S. flexneri*, mas não se aglutinavam com os antissoros contra essa espécie. O projeto de Boyd resultou em uma coleção de milhares de culturas de fezes de diferentes casos de disenteria e isso permitiu-lhe estabelecer a primeira classificação abrangente dos bacilos que causam shigelose e a classificação de uma nova espécie denominada *Shigella boydii* (BOYD, 1931).

No ano de 1950 foi realizado o Congresso da Associação Internacional de Microbiologia que estipulou que o nome do gênero seria *Shigella* spp., e seria dividido em subgrupo A, composto por linhagens de *S. dysenteriae*; subgrupo B, composto por linhagens de *S. flexneri*; subgrupo C, composto por linhagens de *S. boydii*; e subgrupo D, composto por linhagens de *S. sonnei*. (LAMPEL et al., 2018).

1.2. Gênero *Shigella* spp

O gênero *Shigella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, é composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbio facultativos, não formadores de esporos, imóveis e compreende quatro espécies: *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* e *S. flexneri*. São patógenos entéricos exclusivos de humanos e primatas, e responsáveis por causar a shigelose também conhecida como disenteria bacilar (NISA et al., 2020).

A classificação sorológica do gênero é realizada pelo antígeno somático (O) encontrado no lipopolissacarídeo presente na membrana externa da parede celular. *S. dysenteriae* subgrupo A é formada por 15 sorogrupos, *S. flexneri* subgrupo B apresenta 8 sorogrupos, *S. boydii* subgrupo C é constituída por 19 sorogrupos e *S. sonnei* subgrupo D apresenta somente um sorogrupo (NIYOGI, 2005; WHO, 2005; NATARO et al., 2011). Os sorogrupos são verificados

a partir de uma reação antígeno-anticorpo, conhecida como sorotipagem, onde inicialmente se realiza uma aglutinação com soros polivalentes somáticos e posteriormente o sorotipo é pesquisado por testes com soros monovalentes (ZHANG et al., 2014).

Bioquimicamente são fermentadores de glicose sem produção de gás e H₂S, são negativas para as enzimas lisina descarboxilase, oxidase, urease e são incapazes de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono em ágar citrato de Simmons. Todas as espécies de *Shigella* spp. são negativas para a enzima catalase, exceto *S. dysenteriae* Tipo 1 (TORRES, 2004).

Todas as espécies são patogênicas e capazes de invadir o intestino grosso causando uma reação inflamatória, sendo que *S. flexneri* é a principal espécie causadora de shigelose endêmica no mundo. Enquanto *S. sonnei* é mais comum em países desenvolvidos, *S. flexneri* é a espécie mais prevalente em países em desenvolvimento como o Brasil (NUNES et al., 2012; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018).

1.3. *Shigella flexneri*

Entres as quatro espécies de *Shigella* spp., atualmente *S. flexneri* é a espécie mais prevalente em países em desenvolvimento, e afeta não apenas crianças, mas também indivíduos com mais de 40 anos (SEIDLEIN et al., 2006). Em vários países da Ásia e África subsaariana, *S. flexneri* é responsável por até 62% de todas as infecções por bactérias do gênero. Enquanto isso, *S. sonnei* é a espécie mais comum em países desenvolvidos, responsável por até 80% de todas as infecções por *Shigella* spp. na Europa e América do Norte (GU et al., 2012). Já as espécies *S. boydii* e *S. dysenteriae* causam < 5% de todos os casos de shigelose no mundo. Notavelmente, *S. dysenteriae* foi a principal causa da disenteria quando foi identificada pela primeira vez há mais de um século atrás, mas hoje é raramente isolada de pacientes com disenteria bacilar (BARDHAN et al., 2010; GU et al., 2012; THE et al., 2016).

Apesar de *Shigella flexneri* ser um dos principais agentes etiológicos causadores de diarreia em países em desenvolvimento, alguns sorotipos dessa espécie são reportados em regiões desenvolvidas no mundo todo. O número exato de casos da doença e mortes devido à shigelose é incerto, principalmente em regiões em desenvolvimento devido à falta de recursos e dados de pessoas infectadas o que impossibilita a realização de um estudo contínuo de vigilância (NISA et al., 2020).

Uma taxa de mortalidade significativamente maior é associada a *S. flexneri* em comparação com outras espécies de *Shigella* spp. (SUAVE et al., 2016). Estima-se que, entre 60% e 16% dos os casos de disenteria bacilar são causados por *S. flexneri* em países em

desenvolvimento e desenvolvidos, respectivamente (JENNISON & VERMA 2004; KOTLOFF, 2017). Além disso, linhagens resistentes a antibióticos de *S. flexneri* têm sido reportadas globalmente (SEIDLEIN et al., 2006; HOSANGADI et al., 2019).

Os sintomas de shigelose causada por *S. flexneri* podem variar de uma leve disenteria a infecção grave e até fatal. Em caso de infecções leves, particularmente em adulto, as características clínicas da doença causada por *S. flexneri* são fezes aquosas e febre por alguns dias. Entretanto, principalmente em crianças os sintomas são diarreia aguda e aquosa, cólicas abdominais, febre alta, mal-estar e náuseas seguida por vômitos, fezes com muco e sangue, tenesmo e dor abdominal intensa (ASHKENAZI & COHEN, 2013).

As complicações agudas da shigelose causada por *S. flexneri* incluem septicemia, convulsões, danos aos rins, anorexia grave, megacólon tóxico (dilatação do intestino grosso, o que causa uma série de sintomas graves e se não tratado pode ser fatal), perda de peso e desnutrição; peritonite e síndrome hemolítico-urêmica. Esses sintomas são relatados principalmente em crianças desnutridas (TANEJA & MEWARA, 2016).

1.4. Epidemiologia no mundo

O impacto da disenteria bacilar na saúde pública continua a ser observado após mais de 100 anos da descoberta do agente bacteriano por Kyoshi Shiga. A importância de *Shigella* spp. na história médica é singular. A história da pesquisa de *Shigella* spp. também fornece uma linha do tempo dos avanços nas técnicas e conhecimento de doenças infecciosas bacterianas e os paradigmas em evolução no pensamento sobre esses patógenos ao longo do século passado (LAMPEL et al., 2018).

A shigelose tem sido um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento onde é endêmica (LIMA et al., 2015; MEDEIROS et al., 2018). A OMS estimou que no ano de 2010 ocorreram aproximadamente 191 milhões de casos e 1,1 milhões de mortes globalmente (KOTLOFF et al., 1999; KLIRCK et al., 2015; MEDEIROS et al., 2018). O gênero *Shigella* spp. foi relatado como um dos patógenos bacterianos mais comuns que acometem crianças de um a cinco anos de idade no mundo (THE et al., 2016) e a maior parte das mortes (70%) ocorre em países em desenvolvimento (KOTLOFF et al., 1999; KOPPOLU et al., 2013; YANG et al., 2016).

Não existe um grupo de indivíduos que esteja imune à shigelose, mas certos indivíduos estão em maior risco. Várias pesquisas realizadas em centros de tratamento mostram que a *Shigella* spp. está associada a 5% a 15% dos casos de diarreia e 30% a 50% dos casos de disenteria. Em muitas regiões do mundo, a epidemia do HIV se cruza com a disseminação da

shigelose (DRUSIN et al., 1976; DALLMAN et al., 2021). Embora a espécie *S. sonnei* seja mais prevalente em países desenvolvidos como os Estados Unidos, observa-se que a espécie *S. flexneri* é o mais comum em homossexuais masculinos (DRUSIN et al., 1976; DALLMAN et al., 2021). A imunodeficiência associada ao HIV leva a quadros clínicos mais graves de infecção por *Shigella* spp., incluindo persistência ou doença intestinal recorrente e bacteremia (KRISTJANSSON et al., 1994; ANGULO & SWERDLOW, 1995; BATCHELOR et al., 1996; WU et al., 2019; MOHAN et al., 2018).

1.5. Epidemiologia no Brasil

No Brasil dentre os patógenos causadores de gastroenterites, *Shigella* spp. está entre as bactérias mais isoladas de fezes diarreicas em distintas regiões do país (MEDEIROS et al., 2001; DINIZ-SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014; BRASIL, 2019).

A shigelose possui uma prevalência que varia de 8 a 10% em crianças menores de 1 ano de idade e de 15 a 18% em crianças maiores de 2 anos no Brasil (COUTINHO et al., 2001, BRASIL, 2010). Especificamente, as maiores taxas de isolamento de *Shigella* spp. foram registradas nas regiões Sudeste (40%) e Nordeste (34%), enquanto nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sul, as taxas são menores com percentuais de 13%, 10% e 3%, respectivamente. A espécie mais frequentemente isolada foi *S. flexneri* (53%), com maior incidência no Nordeste do Brasil (LIMA et al., 2015).

Devido às proporções continentais do país e as imensas diferenças socioeconômicas entre as regiões, diferentes perfis de incidência de espécies de *Shigella* são observados no Brasil (PEIRANO, SOUZA e RODRIGUES, 2006). A maior incidência de *S. flexneri* é no Nordeste, enquanto o Sudeste, mais industrializado, observa-se que *S. sonnei* é a espécie mais frequentemente isolada (PEIRANO, SOUZA e RODRIGUES, 2006). Assim como em outros países em desenvolvimento, o sorotipo de *S. flexneri* predominante é o 2a, seguido por 1b, 3a, 4a, e 6 (KOTLOFF et al., 1999; PEIRANO, SOUZA e RODRIGUES, 2006). No Brasil, a shigelose não é uma doença de notificação compulsória, sendo notificadas apenas em casos de surtos como o que ocorreu em 2015 em uma escola de Santo André (SP), no qual 56 alunos foram diagnosticados com shigelose (BRASIL, 2019; G1, 2015).

1.6. Transmissão, manifestações clínicas e patogênese

A shigelose é uma doença que ocorre principalmente em aglomerados humanos e comunidades carentes que não possuem saneamento adequado ou água potável (TANEJA &

MEWARA 2016). *Shigella* spp. é transmitida pela via fecal-oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo contato pessoa-pessoa (NIYOGI, 2005). Esse patógeno pode induzir uma infecção sintomática por meio de uma dose infecciosa excepcionalmente baixa (< 100 microrganismos), ao contrário de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, que têm doses infecciosas de pelo menos quatro ordens de magnitude a mais (KOTHARY & BABU, 2002). Pelo fato de a doença ser altamente contagiosa, as bactérias do gênero *Shigella* spp. são responsáveis por surtos e epidemias principalmente em instituições como escolas, creches, penitenciárias, áreas populosas em geral e com saneamento básico precário (KOTHARY & BABU, 2001).

Os manipuladores de alimentos com higiene pessoal precária têm sido frequentemente indicados como fonte para a propagação de *Shigella* spp. Além disso, uma vez que *Shigella* spp. não está associada a um produto alimentar específico, o aumento no número de casos da doença pode estar associado ao manuseio, armazenamento e preparação inadequados de alimentos. O que agrava essas situações é que *Shigella* spp. pode facilmente espalhar-se rapidamente de pessoa para pessoa, o que pode levar a maior número de pessoas infectadas (DUPONT et al., 1989; LAMPEL et al., 2018).

O saneamento deficiente, desnutrição, falta de disponibilidade de água limpa, uma dose infecciosa excepcionalmente baixa, plasticidade genômica e capacidade de adquirir genes de resistência antimicrobiana são potenciais motivos para *Shigella* spp. ser um patógeno tão bem-sucedido (THE et al., 2016).

A shigelose ou desintéria bacilar é uma doença endêmica na maioria dos países em desenvolvimento e é a principal causa de diarreia com sangue no mundo, sendo que menos de 1% desses casos são tratados em hospitais (KOTLOFF et al., 1999; WHO, 2005; THE et al., 2016). Esse sintoma é a principal forma de manifestação, resultante da manifestação da capacidade da *Shigella* spp. de invadir, se multiplicar dentro das células epiteliais do intestino grosso, causar danos, e contaminar as células adjacentes e, por fim, matar as células infectadas. Embora o dano ulcerativo ao epitélio intestinal leve a uma resposta inflamatória intensa, a disseminação sistêmica de *Shigella* spp. é rara.

Em um indivíduo saudável, a doença é autolimitada e se resolve mesmo sem o uso de antibióticos dentro de 2 semanas. Em crianças, menores de 5 anos de idade, e idosos, existe um risco maior de agravamento dos sintomas. A síndrome hemolítico-urêmica (SHU), causada por linhagens produtoras de toxina Shiga, é uma possível sequela da infecção. Existem casos de indivíduos que possuem a forma assintomática de *Shigella* spp., mas a prevalência e duração

reais de sua transmissão dificilmente são constatados (CASTRO et al., 2021; ENITAN et al., 2021).

A patogênese da shigelose se inicia quando a bactéria atravessa o epitélio intestinal via células M (transcitose), e fica exposta aos macrófagos da submucosa do trato gastrointestinal. Após ser fagocitada, a bactéria não é destruída, pois ela induz rapidamente a apoptose dos macrófagos, que as liberam (ZYCHLINSKY, PREVOST, SANSONETTI, 1992; SANSONETTI et al., 1996; HILBI et al., 1998). Dessa forma *Shigella* spp. entra em contato com o lado basolateral das células do epitélio intestinal iniciando o processo de endocitose. O citoplasma da célula hospedeira serve como nicho para a bactéria sobreviver e se replicar (THE et al., 2016). Por isso, ao invés de promover o rápido aniquilamento da célula, as bactérias do gênero *Shigella* spp. prolongam a sobrevivência da célula hospedeira infectada e iniciam a sua proliferação e posteriormente invasão das células vizinhas. (IWAI et al., 2007; THE et al., 2016). Todo esse processo está ilustrado na Figura 1, e resulta em inflamação, sangramento e ulceração da mucosa (THE et al., 2016).

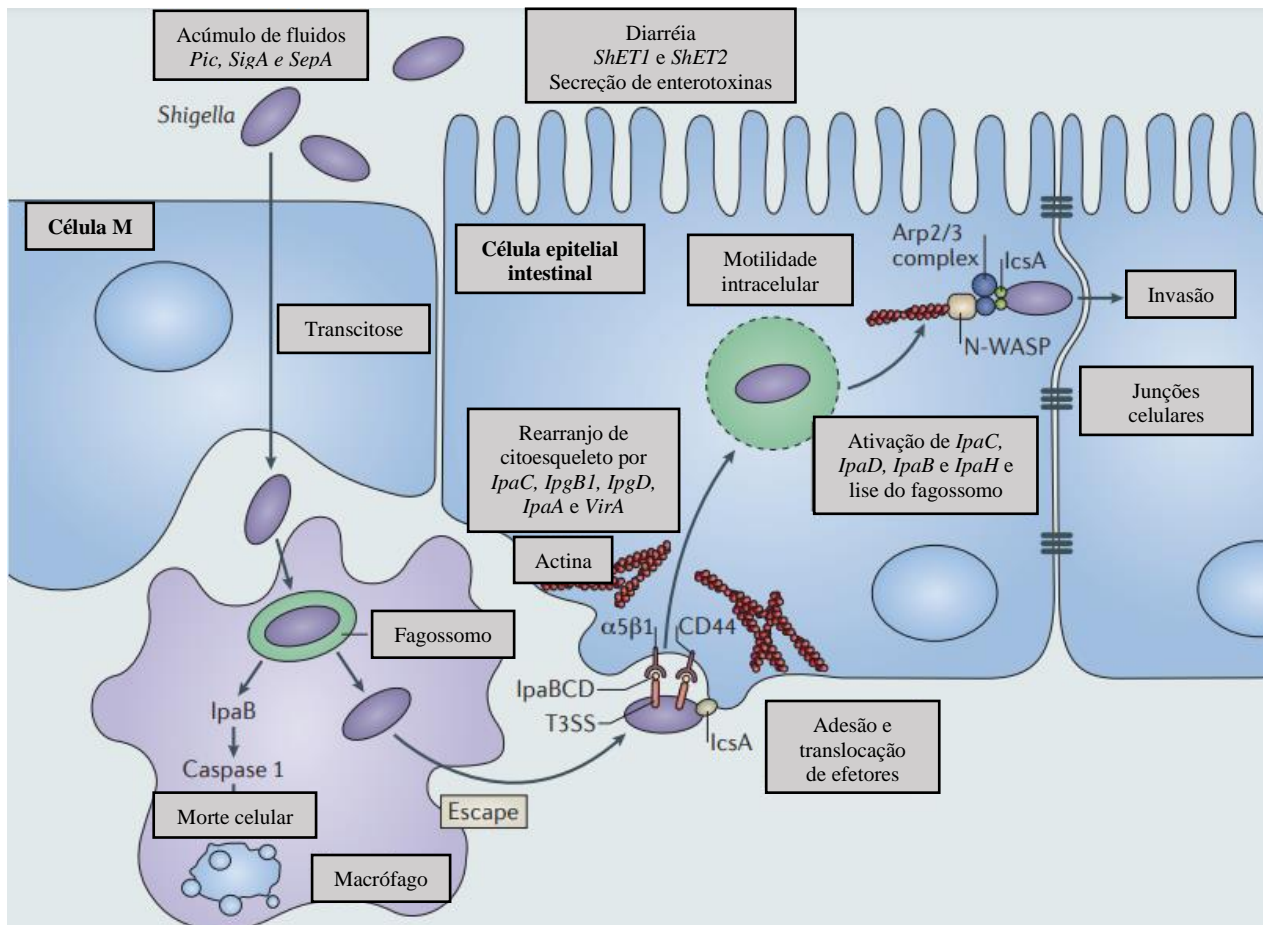


Figura 1. Mecanismo molecular de patogênese de *Shigella* spp. Primeiramente a bactéria atravessa o epitélio intestinal via células M (transcitose), e expõe-se aos macrófagos da submucosa. Após ser fagocitada, a bactéria não é destruída, pois induz rapidamente a apoptose dos macrófagos, que as liberam. Em seguida, entra em contato com o lado basolateral das células do epitélio intestinal iniciando o processo de endocitose. O citoplasma da célula hospedeira serve como nicho para a bactéria sobreviver e se replicar. Por isso ao invés de promover o rápido aniquilamento da célula, *Shigella* spp. prolonga a sobrevivência da célula hospedeira infectada para se proliferar e invadir as células vizinhas. Imagem retirada de The et al., 2016.

1.7. Genes de virulência

A pesquisa dos genes de virulência pode fornecer uma caracterização do potencial patogênico de linhagens de *Shigella* spp. isoladas de surtos e casos esporádicos. Sua capacidade de causar doença depende da expressão de genes contidos em um plasmídeo de invasão (*pINV*) de 220 Kb, tais como: *ipaH*, *ipaBCD*, *ial*, *sen*, *virA*, *virB*, *virF*, *icsA*, *sepA* e *ipgD* e de genes cromossômicos, tais como: *ipaH*, *iuc*, *sat*, *sigA*, *pic*, *set1A* e *set1B* (CAMPOS et al., 2008). A Tabela 1 traz um resumo dos genes acima mencionados e suas respectivas funções.

O plasmídeo *pINV* possui uma região conservada chamada lócus Mxi-Spa (30Kb), a qual codifica o sistema de secreção do tipo III e genes que codificam os antígenos de invasão (*invasion plasmid antigens* – *Ipas*) (THE et al., 2016). Esse plasmídeo é essencial para a

patogenia de *Shigella* spp. O sistema de secreção do tipo III é responsável por injetar proteínas efetoras no interior de células intestinais do hospedeiro, para que ocorra uma profunda interação entre bactéria e célula hospedeira (DONNENBERG, 2000; THE et al., 2016).

Tabela 1. Genes plasmidiais e cromossômicos pesquisados e suas respectivas funções.

Genes Plasmidiais	Funções	Genes Cromossômicos	Funções
<i>IpaH</i>	Invasão	<i>IpaH</i>	Invasão
<i>ial</i>	Invasão	<i>sigA</i>	Secreção de íons
<i>virA</i>	Entrada e sobrevivência em células hospedeiras	<i>iuc</i>	Produção de aerobactina
<i>virF</i>	Ativação transcricional de <i>icsA</i> e <i>virB</i>	<i>pic</i>	Atividade mucinase
<i>sen</i>	Produção de enterotoxinas	<i>sat</i>	Produção de toxina autotransportadora
<i>sepA</i>	Produção de enzimas associadas à invasão	<i>set 1A</i>	Produção de enterotoxinas
<i>ipaBCD</i>	Invasão (sistema de secreção do tipo III)	<i>set 1B</i>	Produção de enterotoxinas
<i>virB</i>	Ativador transcricional do <i>IpaBCD</i>		
<i>icsA</i>	Dispersão intracelular		
<i>ipgD</i>	Entrada e sobrevivência em células hospedeiras		

O gene *IpaH* está presente em várias cópias no plasmídeo e no cromossomo de *Shigella* spp., este gene codifica proteínas envolvidas no processo de invasão de bactérias às células hospedeiras e em sua sobrevivência em macrófagos (CRUZ et al., 2014; FARSHAD, RANJBAR & HOSSEINI, 2015; LLUQUE et al., 2015).

Certos genes são encontrados apenas no plasmídeo *pINV*, entre eles estão: *virF*, um ativador transcricional do gene *icsA* e do gene *virB*. O gene *icsA* atua na dispersão intracelular e o gene *virB* é um ativador transcricional do operon *IpaBCD*, responsável pela expressão de genes de virulência relacionados à invasão de *Shigella* spp. em células hospedeiras em um processo que envolve a ativação do sistema de secreção do tipo III. Similarmente, o gene *ial* (lócus associado à invasão), é responsável por codificar proteínas relacionadas ao processo de invasão. Ademais, o gene *sen* atua na produção de enterotoxinas; o gene *sepA* codifica enzimas associadas à invasão tecidual e promove a inflamação intestinal; o gene *virA* é responsável por criar um caminho que permite que as bactérias se movam através da rede citoplasmática densa

e organizada da célula hospedeira (OGAWA et al., 2008) e o gene *ipgD* atua na entrada e sobrevivência da bactéria nas células hospedeiras (GAO et al., 2013; DUTTA et al., 2014).

O gene cromossômico *sat* codifica uma toxina auto transportadora (SPATEs). Outros genes cromossômicos são o gene *sigA*, que codifica uma proteína capaz de degradar caseína e ser citopática para as células intestinais; o gene *iuc* relacionado com a produção e transporte de aerobactina; *pic* um gene multifuncional envolvido na patogênese entérica e na atividade mucinase; e *set1A* e *set1B* responsáveis pela produção de enterotoxinas (HENDERSON et al., 1999; ZHANG et al., 2014).

1.8. Ensaios *in vivo* com o modelo de larvas *Galleria mellonella*

Embora as infecções naturais por *Shigella* spp. sejam restritas a humanos e primatas, outros modelos animais menores podem ser usados para analisar etapas específicas que ocorrem na infecção por *Shigella* spp. Nenhum modelo animal reproduz totalmente a resposta humana e muitas vezes a manutenção desses modelos exigem animais caros, manutenção dispendiosas de instalações, serviços veterinários e protocolos de animais aprovados por comitês de ética. As larvas da lagarta de *Galleria mellonella* são um modelo *in vivo* muito mais simples, barato, informativo e rápido para avaliação da virulência e da interação de *Shigella* spp. com células da imunidade inata do inseto (BARNOY et al., 2017).

A *Galleria mellonella* é uma espécie de inseto lepidóptero também conhecida como a traça grande da cera ou a traça do favo de mel, é uma traça da família *Pyralidae* e se tornou um modelo de inseto amplamente adotado para estudar vários patógenos humanos, incluindo *Listeria* spp, *Streptococcus*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros (BARNOY et al., 2017). O sistema imune inato humano e o de insetos demonstram várias semelhanças o que permite que os estudos sejam realizados e extrapolados para organismos de diferentes Reinos (BARNOY et al., 2017).

Barnoy e colaboradores (2017) realizaram um estudo no qual foram inoculadas linhagens de *S. flexneri* em larvas de *Galleria mellonella*. Foi observado que as taxas de mortalidade das larvas eram dependentes da dose infecciosa e da presença do plasmídeo de virulência. A histologia das larvas infectadas em conjunto com técnicas de fluorescência, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão indicaram que *S. flexneri* se concentra dentro de vacúolos dos hemócitos do inseto que estruturalmente se assemelham a vacúolos descritos em estudos com camundongos e humanos em linhagens celulares de macrófagos. Alguns desses vacúolos carregados de bactérias tinham membranas duplas características de fagossomos (BARNOY et al., 2017).

Os resultados obtidos por Barnoy e colaboradores (2017) sugerem que larvas de *G. mellonella* podem ser usadas como modelo *in vivo* para entender a patogênese da *Shigella* spp., sendo que os procedimentos nos estudos com esse modelo são mais simples, menos dispendiosos financeiramente e requerem um menor tempo para a realização dos experimentos.

Diferentes formas de tratamento para a shigelose podem ser investigadas com o uso de larvas de *G. mellonella*. Zaineebedeen e colaboradores (2018) avaliaram a capacidade de um composto presente em óleos essenciais de plantas chamado geraniol de proteger as larvas de *G. mellonella* contra infecção causada por *S. sonnei*. Liu e colaboradores (2017), analisaram eficácia da combinação dos antimicrobianos ciprofloxacina e fosfomicina em larva de *G. mellonella* infectadas com linhagens de *S. flexneri* resistentes a ciprofloxacina.

Entretanto, até o presente momento não existe nenhuma pesquisa publicada com larvas de *G. mellonella* como modelo *in vivo* utilizadas no estudo de linhagens de *Shigella* spp. isoladas no Brasil.

1.9. Resistência a antimicrobianos

O monitoramento de linhagens resistentes de *Shigella* spp. é essencial no Brasil e no mundo, pois é importante para que a terapia seja eficiente quando necessária (BASTOS & LOUREIRO, 2011; NUNES et al., 2012). Infelizmente, o número de linhagens multirresistentes de *Shigella* spp. está aumentando, incluindo resistência as cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas. Assim, estudos relacionados ao perfil de resistência de *Shigella* spp. são importantes para ajudar no monitoramento e controle dos casos desta doença (ZAIDI et al., 2013; QU et al., 2014; ZHANG et al., 2014; HOSANGADI et al., 2017).

Nos últimos anos foi observado um aumento e mudança nos padrões de resistência a antimicrobianos por *Shigella* spp (MARDANEH et al., 2013; KLONTZ et al., 2015; BROWN et al., 2017; KARIMI-YARDI et al., 2020). Segundo Bhattacharya e colaboradores (2015), na Índia, país em desenvolvimento assim como o Brasil, de 2000 a 2005 *Shigella* spp. apresentava resistência a 13 antimicrobianos diferentes, esse número aumentou para 43 no período de 2006 a 2011. A resistência às fluoroquinolonas, e cefalosporinas de terceira geração que não tinha sido observada durante o período de 2000 a 2005, surgiu no período de 2006 a 2011 (BHATTACHARYA et al., 2015).

Recentemente também se observou a resistência de linhagens de *Shigella* spp. aos antibióticos mais comumente usados na terapia clínica, como tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima e ampicilina (VUBIL et al., 2018). De acordo com recomendações recentes da *American Society for Infectious Diseases* (IDSA), a ceftriaxona,

uma cefalosporina de terceira geração, e as quinolonas ciprofloxacina e norfloxacina, são drogas de escolha para o tratamento da shigelose. No entanto, várias linhagens de diferentes espécies de *Shigella* spp. tornaram-se resistentes a esses antimicrobianos em muitos países (GUERRANT et al., 2001; POIREL, BONNIN e NORDMANN, 2012).

No Brasil existem relativamente poucos estudos que investigaram a resistência de linhagens de *S. flexneri* a diferentes classes de antimicrobianos, porém estes demonstraram a presença de resistência a vários antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica (SIDRIM et al., 1998; MESQUITA et al., 2009; BASTOS et al., 2010; BASTOS & LOUREIRO 2011; GONZALES et al., 2020). Todos esses estudos publicados no Brasil evidenciaram a acentuada resistência de *S. flexneri* a diversos antimicrobianos e a necessidade de um monitoramento contínuo dos padrões de resistência de *Shigella* spp. no país.

1.10. Métodos de tipagem molecular

A tipagem molecular microbiana tem como objetivo principal avaliar as relações genéticas entre os microrganismos isolados, o que é essencial para a determinação de rotas e fontes de infecção, identificação de surtos e contaminações cruzadas de patógenos relacionados a saúde, identificação de linhagens virulentas e na avaliação da eficácia de medidas de controle microbiológico. Dessa maneira, a tipagem bacteriana tem contribuído substancialmente na melhora da eficácia dos sistemas de vigilância e nas estratégias de controle em saúde pública (TENOVER et al., 1997; MACCANNELL, 2013; RANJBAR et al., 2014).

Os métodos tradicionais de tipagem bacteriana são baseados em metodologias fenotípicas tais como, sorotipagem, biotipagem, fagotipagem, padrão de resistência a antimicrobianos, entre outros. Entretanto, essas metodologias de tipagem fenotípica são, muitas vezes, limitadas devido a sua baixa capacidade em discriminar linhagens pertencentes a uma mesma espécie (OLIVE & BEAN, 1999; FOXMAN et al., 2005). Assim, métodos genotípicos têm sido cada vez mais utilizados na identificação, caracterização e em estudos epidemiológicos e taxonômicos bacterianos complementando os métodos convencionais baseados em características fenotípicas e auxiliando na compreensão da estrutura genômica de diferentes patógenos (COOPER & FEIL, 2004).

O sucesso da implementação e utilização de um método de tipagem molecular depende do seu poder discriminatório, que mede a capacidade de um método em atribuir um padrão molecular específico para um isolado, a proporção de linhagens diferenciadas e a reprodutibilidade do método (HUNTER, 1990; MASLOW et al., 1993).

A concordância epidemiológica, ou seja, a correlação entre o agrupamento de determinadas linhagens por um determinado método, as informações epidemiológicas disponíveis para essas linhagens, além da possibilidade de automação para que se tenha um elevado rendimento são considerações importantes na escolha de um método de tipagem (VAN BELKUM et al., 2007).

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

A reação de polimerase em cadeia baseada na amplificação de uma sequência intergênica repetitiva que é um palíndromo imperfeito de 127 pb e está presente em múltiplas cópias no genoma de enterobactérias e vibrios, denominada *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR) é uma técnica rápida utilizadas nas investigações de surtos, na elucidação da transmissão da shigelose, e usualmente, têm validado os dados obtidos por PFGE (LIU et al., 1995; LEE et al., 2003; SURDEANU et al., 2003; PENATTI et al., 2007; KOSEK et al., 2012; SERIBELLI et al., 2016).

Hulton e colaboradores (1991), foram os primeiros pesquisadores que descreveram as sequências ERIC em *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e em outros membros da família *Enterobacteriaceae*. As funções, origens e a evolução das sequências ERIC permanecem desconhecidas. Contudo, existe a hipótese que essas sequências possam ter funções que não são fundamentais ao crescimento e sobrevivência desses patógenos (WILSON & SHARP, 2006).

Segundo Wilson e Sharp (2006), a técnica de ERIC-PCR é realizada para distinguir linhagens bacterianas por meio de *primers* confeccionados a partir das sequências ERIC presentes no genoma bacteriano. Portanto, a amplificação ocorre entre as cópias das sequências ERIC formando fragmentos de tamanhos variados que são revelados em uma eletroforese convencional de gel de agarose (VERSALOVIC et al., 1991).

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

No Brasil, os poucos estudos que caracterizam molecularmente linhagens de *Shigella* spp. por ERIC-PCR demonstraram que esta metodologia é robusta e eficiente (PENATTI et al., 2007; SERIBELLI et al., 2016; GONZALES et al., 2020).

1.10.2. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

A técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) foi descrita no início da década de 1980 com o objetivo de se estudar o DNA cromossômico de eucariotos (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; FOXMAN et al., 2005). É considerada como uma das melhores metodologias a serem utilizadas na tipagem molecular de bactérias enteropatogênicas e tem como princípio básico a clivagem do DNA, utilizando enzimas de restrição de corte raro originando fragmentos moleculares de comprimento grande.

Esta técnica baseia-se na construção de *plugs* de agarose a partir de uma suspensão bacteriana. Posteriormente, a bactéria inteira que se encontra embebida no *plug* é lisada através do uso de detergentes e proteinase K, obtendo-se assim, o DNA bacteriano livre, que é então digerido com uma enzima de restrição que possui poucos sítios de reconhecimento gerando um perfil com aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 Kb em tamanho. De maneira geral, todos esses fragmentos podem ser separados em um padrão de bandas distintas por PFGE quando submetidos a uma corrente elétrica em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos (pulsos). Nessa técnica a corrente elétrica é aplicada, primeiramente, em uma direção a partir de um conjunto de eletrodos, em seguida, a corrente migra para um segundo conjunto de eletrodos por um curto período e então, migra para um terceiro conjunto de eletrodos. Assim, o DNA migra de forma serpentina através do gel e os fragmentos gerados pela digestão da enzima são separados com eficiência (TENOVER et al., 1997).

A análise do padrão de bandas das diferentes linhagens é realizada por *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo a similaridade genômica entre elas (SINGH et al., 2006). Assim, o PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular que possui um grande poder discriminatório e vem sendo aplicada com sucesso na tipagem de uma quantidade numerosa de espécies bacterianas, isoladas no Brasil e em outros locais do mundo (TENOVER et al., 1997; RIBOT et al., 2001; DENIS et al., 2008; GOERING, 2010; O'LEARY et al., 2011; ABLEY et al., 2012; WIECZOREK et al., 2013; GONZALES et al., 2020).

No Brasil, há relativamente poucos trabalhos publicados que tiparam linhagens de *Shigella* spp. por PFGE (ANGELINI et al., 2009, LIMA et al., 1997; SERIBELLI et al., 2016; GONZALES et al., 2020). Em todos os estudos a metodologia discriminou adequadamente as linhagens analisadas.

1.10.3. *Multi-locus sequence typing* (MLST)

A metodologia do MLST foi proposta por Maiden e colaboradores como uma metodologia capaz de superar os problemas de reprodutibilidade inter laboratoriais e abolir a grande dificuldade de se analisar as relações genéticas entre isolados de diferentes locais do mundo em laboratórios distintos (MAIDEN et al., 1998).

Essa metodologia baseia-se no sequenciamento de alguns genes essenciais ou de manutenção, denominados genes *housekeeping*. Após o sequenciamento, as sequências são depositadas em um banco de dados online sendo cada sequência correspondente a um alelo. Sequências distintas são caracterizadas como diferentes alelos e recebem, arbitrariamente, um número de identificação. O conjunto de alelos de cada amostra bacteriana dá origem ao *sequence typing* (ST) que é utilizado em análises filogenéticas, populacionais e evolucionárias (MAIDEN et al., 1998; URWIN & MAIDEN, 2003).

O MLST possui a vantagem de ser altamente reprodutível além do fato de que seus resultados podem ser disponibilizados em bancos de dados online, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes regiões do mundo (MAIDEN et al., 1998).

Especificamente para *S. flexneri* a técnica de *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) baseia-se na sequência de sete genes “*housekeeping*”, os quais fornecem resultados que podem ser comparados com o mundo inteiro, devido a um banco de dados que utiliza um protocolo padrão de *Escherichia coli* (TARTOF et al., 2005; CAO et al., 2012).

Até o presente momento, não existem no Brasil estudos publicados que tiparam linhagens de *S. flexneri* pela técnica de MLST.

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Estima-se que *Shigella* spp. infecte entre 164,7 e 200 milhões de pessoas no mundo anualmente, e 1,1 milhão de mortes são atribuídas a este patógeno (ANDERSON et al., 2019; KOTLOFF et al., 1999; TROEGER et al., 2017). A maioria dos infectados por *Shigella* spp. vive em países em desenvolvimento onde a doença é causada principalmente pela espécie *S. flexneri* (LAMPEL et al., 2018). Crianças com até 5 anos, especialmente subnutridas, são as mais suscetíveis a doença e têm o maior índice de mortalidade. *S. flexneri* foi reportada como responsável por aproximadamente 10% de todos os episódios diarreicos em crianças menores de cinco anos no mundo (PEIRANO et al., 2006). Particularmente, vale destacar a emergência de linhagens de *S. flexneri* MDR em vários países, com aumento marcante de resistência à quinolonas e cefalosporinas (TANEJA & MEWARA, 2016; HOSANGADI et al., 2017).

Apesar da shigelose causar um grande impacto na saúde pública no Brasil, existem relativamente poucos estudos publicados com linhagens isoladas no país, sendo que a maioria deles investigou a ocorrência de *Shigella* spp. em diferentes regiões, o perfil de resistência a antimicrobianos e algumas características fenotípicas de tais linhagens (TIEMENS et al., 1984; LIMA et al., 1995; SIDRIM et al., 1998; ORLANDI et al. 2001; PEIRANO et al., 2006; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; BANDO et al., 2010; DE PAULA et al., 2010; BASTOS & LOUREIRO, 2011; NUNUES et al., 2012; LIMA et al., 2013; SOUSA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2021). Porém, poucas pesquisas caracterizaram molecularmente um número expressivo de linhagens de *S. flexneri* isoladas de humanos por décadas no país (PENATTI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; MORENO et al., 2009; SOUZA et al., 2013; CRUZ et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018; GONZALES et al., 2020).

Especificamente, há uma escassez de estudos publicados com linhagens de *S. flexneri* isoladas no Brasil que analisaram a capacidade de bactérias desta espécie invadirem e sobreviverem em células epiteliais do intestino e em macrófagos de humanos (BANDO et al., 2010; LIMA et al., 2013). Ademais, não há dados publicados que verificaram a virulência utilizando como modelo *Galleria mellonella* e de tipagem por MLST de linhagens desta espécie isoladas no país.

Diante da importância clínica deste gênero bacteriano e relativa escassez de estudos no país, os objetivos deste estudo foram avaliar a diversidade genotípica, o perfil de resistência a antimicrobianos e o potencial patogênico pela utilização de diversos métodos fenotípicos e moleculares de um número expressivo de linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes diarreicas de humanos por um período de 34 anos em diferentes Estados do país.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar linhagens de *Shigella flexneri* isoladas de humanos com gastroenterite, de 1983 a 2017 em diferentes Estados do Brasil, quanto ao seu potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade genotípica.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o potencial patogênico pela pesquisa da frequência de 16 genes de virulência por PCR em todas as linhagens de *S. flexneri* estudadas;
- Analisar comparativamente a capacidade de invasão e sobrevivência em células epiteliais de humanos (Caco-2) de linhagens de *S. flexneri* selecionadas;
- Analisar comparativamente a capacidade de sobreviver em macrófagos de humanos (U-937) de linhagens de *S. flexneri* selecionadas;
- Avaliar a virulência de linhagens de *S. flexneri* selecionadas em *Galleria mellonella*;
- Determinar o perfil de resistência a 16 antimicrobianos de diferentes classes por disco difusão em todas as linhagens estudadas;
- Analisar a diversidade genotípica de todas as linhagens de *S. flexneri* estudadas por ERIC-PCR e PFGE;
- Tipar linhagens selecionadas de *S. flexneri* por MLST.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas um total de 130 linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes diarreicas de humanos de 1983 a 2017 na região Norte, nos Estados do Amapá, Pará e Rio Grande do Norte; na região Nordeste, nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Sergipe; na região Sul, no Estado do Rio Grande do Sul e, na região Sudeste, nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Tabela 2). Essas linhagens foram selecionadas nas coleções de cultura do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL-RP) e da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ) a fim de representar os diferentes anos e locais de isolamento. As linhagens de *S. flexneri* foram confirmadas por testes bioquímicos e sorológicos da Probac do Brasil (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil)

Tabela 2. Anos e Estados das 130 linhagens de *Shigella flexneri* estudadas isoladas de fezes diarreicas de humanos de 1983 a 2017 no Brasil.

Ano	Estado de isolamento (número de linhagens)
1983	SP (10)
1984	SP (9)
1985	SP (7)
1986	SP (3)
1987	SP (4)
1988	SP (5)
1989	SP (4)
1990	SP (2)
1991	SP (2)
1992	SP (3)
1993	SP (3)
1994	SP (5)
1995	SP (3)
1996	SP (4)
1997	SP (5)
1998	SP (7)
1999	SP (1)
2000	SP (5)
2001	SP (1)

2002	SP (1)
2003	SP (3)
2004	SP (1)
2005	SP (1)
2006	SP (1)
2010	RS (2)/PA (2)/SP (1)
2011	RS (1)/RN (1)
2012	RJ (1)/RS (1)/PE (1)/RS (1)/MA (1)
2013	SP (5)/RN (1)/RJ (2)/PE (4)/RS (2)/MG (1)
2014	CE (2)/RS (3)
2015	AP (2)/RS (1)/MA (1)/PE (2)
2017	BA (1)/RS (1)/SE (1)

Abreviações: AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais, PA: Pará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo; SE: Sergipe.

4.2. Detecção de genes de virulência por PCR convencional

A detecção dos genes de virulência foi realizada para as 130 linhagens de *S. flexneri* estudadas (Tabela 2). O DNA genômico foi extraído de acordo com Campioni & Falcão (2014) e as concentrações de DNA foram determinadas conforme descrito por Sambrook & Russell (2001). O procedimento geral de PCR foi realizado de acordo com Falcão et al. (2006). Os *primers* ou oligonucleotídeos utilizados e as condições de PCR de cada gene de virulência investigado foram descritos nas seguintes referências: *ipaH* e *iuc* em Kingombe et al. (2005); *ipaBCD* em Faruque et al. (2002); *ial* em Frankel et al. (1989); *set1A* e *set1B* em Fasano et al. (1995); *sen* em Farfan et al. (2010); *sat*, *sigA*, *pic* e *sepA* em Boisen et al. (2009) e *virF* em Vidal et al. (2005), e estão resumidos na Tabela 3. Uma reação de PCR sem DNA foi usada como branco e uma reação de PCR com DNA de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 foi usada como controle negativo. Os controles positivos foram *S. flexneri* ATCC 12022 e *S. sonnei* ATCC 25931. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (0,5 µg ml⁻¹).

Tabela 3. Sequência de *primers*, tamanho do *amplicon*, temperatura de hibridação e referências.

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de hibridação(°C)	Referências
<i>ipaH</i>	AAGTTCTGACGCGATTGG TGTACGCGATCAAGAATCCC	613	57	Kingombe et al. (2005)
<i>ipaBCD</i>	GCTATAGCAGTGACATG ACGAGTTCGAAGCACTC	500	59	Faruque et al. (2002)
<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAATTATTTC	320	55	Frankel et al. (1989)
<i>set1A</i>	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGGTA	309	55	Fasano et al. (1995)
<i>set1B</i>	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAATGACG	147	55	Fasano et al. (1995)
<i>sen</i>	TTGCATCAGCCTGTCCATTA AAAACGGTTCATGGGGAGAT	968	56	Farfan et al. (2010)
<i>sat</i>	TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	930	59	Boisen et al. (2009)
<i>iuc</i>	CAGACGCAGGTCCTCTCTCATA GCTCGCTACCAGTCACACACTT	222	70	Kingombe et al. (2005)
<i>virF</i>	AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	618	59	Vidal et al. (2005)
<i>sepA</i>	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	58	Boisen et al. (2009)
<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTTG	430	58	Boisen et al. (2009)
<i>pic</i>	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG	572	58	Boisen et al. (2009)
<i>ipgD</i>	CCACCGGAATTCTTATACAAATGAC GAATACCC	1618	51	Lan et al. (2001)
<i>virA</i>	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACATC TGATGAGCTAACTTCGTAAGC CCTCC	215	58	Vilalobo & Torres (1998)
<i>virB</i>	AAGTTCTGACGCGATTGGGTACGCG ATCAAGAATCCC	251	55	Müller et al. (2007)
<i>icsA</i>	TGATGGACTTTCTCCCTTGG CCGCTACCACCAAGAATCAT	220	55	Lett et al. (1988)

4.3. Ensaio da capacidade de invasão e sobrevivência em células Caco-2

Inicialmente, as 50 linhagens de *S. flexneri* destacadas (*) no Apêndice I e a linhagem referência *S. flexneri* ATCC 12022 foram crescidas em placas de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). O crescimento bacteriano foi inoculado em 5mL de caldo BHI e incubado a 37°C, por 16 horas para atingir a fase estacionária de crescimento bacteriano. Após as 16 horas de incubação, foi medida a Densidade Óptica em 600nm para confirmar se as culturas bacterianas se encontravam em na fase estacionária. Após o ajuste da D.O₆₀₀ para 1.0, o volume de 1mL da cultura em BHI, o que corresponde a aproximadamente 1.10⁸ UFC.mL⁻¹ (BARNOY et al., 2017), foi centrifugado a 8.000g por 5 minutos e subsequentemente ressuspensionado em 1 mL de

meio de cultura para células *Minimum Essential Media* (MEM) sem antibiótico e/ou soro fetal bovino.

As amostras ressuspensas foram acondicionadas em gelo até o momento do ensaio. As placas de 12 poços contendo 1.10^5 células Caco-2 em cada poço foram anteriormente preparadas e submetidas a um período de diferenciação celular de 12 dias em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. O ensaio de invasão ocorreu observando a semi-confluência das células Caco-2 nos poços e a multiplicidade de infecção (MOI) utilizada foi de 100:1 (HU et al., 2008; POLI et al., 2012; KOOLMAN et al., 2016; WYSOK; WOJTACKA, 2018).

No momento do ensaio, as placas de 12 poços foram retiradas da estufa de 5% de CO₂ e os poços foram lavados com *Phosphate buffered saline* 1X (PBS 1X). Em seguida foram adicionados 900µL do meio MEM sem antibiótico e/ou soro fetal bovino a cada poço da placa e 100µL da suspensão bacteriana descrita acima. As placas foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500g e posteriormente incubadas por 90 minutos na estufa de 5% de CO₂ a 37°C o que permitiu a interação célula-bactéria (DETWEILER et al., 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

Após esse período o meio de cultura foi retirado dos poços e lavados uma vez com PBS 1X. Nessa etapa foi adicionado a cada poço 1mL de meio de cultura contendo gentamicinana na concentração de 30µg/mL e a placa foi incubada por 90 minutos para que o antibiótico adicionado pudesse agir sobre as bactérias que não invadiram as células Caco-2 matando-as e consequentemente eliminando-as do experimento (DETWEILER et al., 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

Após a incubação o meio com antibiótico foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X e 1mL de meio MEM sem antibiótico e/ou soro bovino fetal foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada por 3 horas em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. Subsequentemente, o meio dos poços foi retirado e lavado com PBS 1X, em seguida 1mL de Triton X-100 a 1% foi adicionado. Após 5 minutos de incubação, as células foram devidamente lisadas para a avaliação da viabilidade bacteriana. A viabilidade bacteriana foi avaliada por plaqueamento de 10µL de diluição seriada em PBS para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) viáveis em ágar Mueller Hinton (MH). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três poços contendo apenas células Caco-2 foram utilizados como controle negativo.

4.4. Caracterização da capacidade de sobrevivência e multiplicação em macrófagos U-937

O inóculo para a realização do experimento foi obtido conforme o item 4.3 para as 50 linhagens destacadas (*) no Apêndice I. Após o ajuste da D.O₆₀₀ para 1.0, o volume de 1mL da

cultura em BHI foi centrifugado a 8.000g por 5 minutos e ressuspensas em 1mL de meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) sem antibiótico e/ou soro fetal bovino. As amostras ressuspensas foram acondicionadas em gelo até o momento do ensaio. As placas de 24 poços contendo 1.10^5 células U-937 em cada poço foram preparadas 72 horas antes da realização do ensaio. No momento da preparação da placa 1 μ L de *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) foi acrescentado a cada 50 μ L de meio de cultura contendo células U-937. A suspensão foi distribuída no volume de 1mL para cada poço e incubada por 48 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C objetivando a ativação e diferenciação celular (monócito-macrófago) e consequente adesão das células ao poço (SUNDSTROM; NILSSON, 1976; SANTOS et al., 2010).

Após as 48 horas, o meio de cultura foi trocado por RPMI sem antibiótico, soro fetal bovino e PMA. Foi feita a incubação por mais 24 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. O ensaio ocorreu observando a semi-confluência das células U-937 nos poços e o MOI utilizado foi de 100:1 (KOOLMAN et al., 2016; WYSOK; WOJTACKA, 2018).

No momento do ensaio, as placas de 24 poços foram retiradas da estufa de 5% de CO₂ e os poços foram lavados com PBS 1X. Em seguida foram adicionados 900 μ L do meio RPMI sem antibiótico e/ou soro fetal bovino a cada poço da placa e 100 μ L da suspensão bacteriana descrita acima. As placas foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500g e posteriormente incubadas por 30 minutos na estufa de 5% de CO₂ a 37°C o que permitiu a interação célula-bactéria (DETWEILER et al., 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

Subsequentemente, o meio de cultura foi retirado dos poços, que foram lavados uma vez com PBS 1X. Nessa etapa foi adicionado 1mL de meio de cultura RPMI contendo gentamicina na concentração de 30 μ g/mL a cada poço e feita a incubação por 90 minutos para que o antibiótico adicionado pudesse agir sobre as bactérias que não foram internalizadas pelos macrófagos em estudo matando-as e consequentemente eliminando-as do experimento (DETWEILER et al., 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

Após a incubação, o meio com antibiótico foi retirado, os poços com PBS 1X foram lavados e 1mL de meio RPMI sem antibiótico e/ou soro fetal bovino foi adicionado a cada poço, em seguida foi feita a incubação da placa por 3 horas em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. Retirou-se o meio dos poços, que foram subsequentemente lavados com PBS 1X e feita a adição de 1mL de Triton X-100 a 1% em cada poço. Após 5 minutos de incubação, as células foram devidamente lisadas para a avaliação da viabilidade bacteriana. A viabilidade bacteriana foi avaliada por plaqueamento de 10 μ L de diluição seriada em PBS para a contagem de UFCs

viáveis em ágar Mueller Hinton (MH). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três poços contendo apenas células U-937 foram utilizados como controle negativo.

4.5. Avaliação da virulência de *S. flexneri* em *Galleria mellonella*

Foram selecionadas oito linhagens de *S. flexneri* destacadas (£) no Apêndice I e a linhagem referência *S. flexneri* ATCC 12022. As linhagens foram cultivadas em placa de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). O crescimento bacteriano foi inoculado em 5 mL de caldo BHI e incubado a 37°C, por 16 horas para atingir a fase estacionária de crescimento bacteriano. Após as 16 horas de incubação, foi medida a Densidade Óptica em 600nm da cultura bacteriana para confirmar a fase estacionária. Foi feito o ajuste da D.O₆₀₀ para 1,0 que corresponde a aproximadamente 1.10⁸ UFC.mL⁻¹. Com uma micro-seringa Hamilton (modelo 7000,5KH de 10 µL) foi feita a inoculação de larvas de *G. mellonella* no centro da última pró-pata direita com 5 µL de *S. flexneri* (10⁸ CFU.mL⁻¹) para cada um dos oito isolados selecionados e para o controle positivo infectado com a linhagem *S. flexneri* ATCC12022. O controle negativo foi inoculado apenas com PBS. Larvas Naïve, ou seja, sem a inoculação de nenhum composto foram utilizadas também como controle no experimento.

As larvas de *G. mellonella* foram mantidas a 28°C no escuro em recipientes de vidro (30 cm de altura - 20 cm de largura - 2 L capacidade) com oxigênio adequado e acesso a alimentos até atingir o sexto estágio, cujo peso está entre 200 mg e 250 mg. Após o desenvolvimento completo, as larvas foram privadas de alimentos e separados em grupos de 10 unidades em placas de Petri de vidro para cada isolado bacteriano e controles. Após a inoculação, as larvas foram incubadas a 37°C, privadas de alimento e luz direta. Durante o período de 10 dias do experimento as larvas foram retiradas a cada 24 horas as pré-pupas, a fim de retardar sua metamorfose com dados da mortalidade de larvas registrados diariamente.

Os gráficos e análises estatísticas dos ensaios foram realizadas pelo método Log-rank (Mantel-Cox), ambos no programa *Prism5* para Windows do software *GraphPad1* (versão 5.01). Para todas as análises, o nível de significância foi $\alpha=5\%$.

4.6. Determinação do perfil de resistência antimicrobiana por disco difusão

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado para as 130 linhagens de *S. flexneri* estudadas e listadas na Tabela 1, utilizando o método de difusão em disco, seguindo as orientações descritas pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* - CLSI (2017). A escolha dos antimicrobianos foi baseada no documento CLSI (2017) incluindo aqueles recomendados para tratamento humano e aqueles descritos por de Paula et al. (2010), Bastos & Loureiro

(2011), Nunes et al. (2012) e Zhang et al. (2014). Os antimicrobianos testados foram (μg por disco, salvo indicação em contrário): ácido nalidíxico (30), ampicilina (10), gentamicina (10), ácido amoxicilina-clavulânico (30), cefepima (30), cefotaxima (30), ciprofloxacina (5), levofloxacina (5), imipenem (10), ampicilina-sulbactam (20), sulfametoxazol-trimetoprima (25), ceftazidima (30), cloranfenicol (30), tetraciclina (30), ofloxacina (5) e piperacilina (100) (todos da Oxoid). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como linhagem de controle de qualidade.

4.7. Tipagem molecular por ERIC-PCR

As seqüências ERIC foram amplificadas para todas as 130 linhagens de *S. flexneri* estudadas e listadas na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 μL . A Tabela 4 traz de forma detalhada os reagentes e as concentrações utilizadas na reação de ERIC-PCR. Os primers utilizados foram: ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'), conforme descrito por Versalovic; Koeuth e Lupski (1991).

Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados na reação de ERIC-PCR.

Componentes	Volume (μL)
10X Ex Taq Buffer ^a	5
dNTP Mixture (2,5mM cada) ^a	4
0,2-1,0 μM Primer forward	5
0,2-1,0 μM Primer reverse ^b	5
Takara Ex Taq (5U) ^a	0,25
DNA Genômico (100-500ng)	1
H ₂ O destilada ultrapura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50

^a Produto Takara; ^b Produto Invitrogen

As condições das reações de amplificação foram as seguintes: Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 98°C por 10 segundos, seguido por 30 ciclos constituídos de:

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

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação de ERIC-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 80V por 3,0 horas, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos e descorados em água por 1 hora, visualizados por transluminador ultravioleta e registrados em software fotográfico. As reações de PCR foram feitas em duplicata para verificar a reprodutibilidade das reações de amplificação.

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

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

4.7.2. Construção do dendrograma de similaridade genética

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

4.8. Tipagem molecular por PFGE

4.8.1. Preparação dos *plugs* de agarose

A técnica de PFGE foi realizada para todas as 130 linhagens de *S. flexneri* listadas na Tabela 2. Os *plugs* de agarose contendo o DNA genômico das linhagens foram preparados seguindo o protocolo descrito por Ribot et al. (2006). Inicialmente as linhagens cresceram de 12-18 horas em 3,0 mL de caldo BHI (HiMedia) a 37°C por 24 horas. Após isso, a semeadura das linhagens foi feita em ágar TSA (Tryptona Soja Ágar) (Kasvi) incubado a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado a 3 mL do tampão de suspensão de células (100mM Tris; 100mM EDTA) até atingirem a D.O._{610nm} de 0,8-1,0 (BARNOY et al., 2017). As suspensões foram colocadas em gelo para cessar o crescimento bacteriano. Em seguida, transferimos 200 µL da suspensão de células para um tubo de 2 mL para cada amostra e estes foram colocados em banho seco a 60°C. Foram adicionados 10 µL de proteinase K (20mg/mL) e 200 µL de 1% de agarose Seakem Gold (Lonza) em cada tubo com a suspensão de células. Essas misturas foram transferidas para os poços dos moldes (70-80 µL por poço) lembrando-se de evitar a formação de bolhas durante esse processo. Esperou-se a solidificação dos *plugs* em temperatura ambiente (10-15 minutos) ou em geladeira (4°C - 5 minutos).

4.8.2. Lise celular dos *plugs* de agarose

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

4.8.3. Lavagem dos *plugs* de agarose

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

4.8.4. Digestão dos *plugs* de agarose

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

4.8.5. Corrida eletroforética

Foram pesados 1,5g de agarose *Seakem Gold* (Lonza) e dissolvidos em 150 mL de tampão TBE 0,5X (45mM Tris; 45mM Ácido bórico; 1mM EDTA) para a confecção do gel de agarose. Durante a corrida eletroforética o tampão TBE 0,5X também foi utilizado totalizando 2500 mL de preparo. Para selar os *plugs* que foram colocados no gel, 2 mL da agarose fundida haviam sido separados e colocados no banho seco 60°C até o momento do uso. Os fragmentos da macrorestrição foram submetidos à corrida eletroforética de campo pulsado em programa de 1 bloco no aparelho CHEF-DRIII system (Bio-Rad), sob as seguintes condições: pulso inicial de 2,2 segundos, pulso final de 54,2 segundos, voltagem de 6 v/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 19 horas, conforme descrito por Ribot et al. (2006). O marcador de peso molecular

utilizado foi a linhagem *Salmonella Braenderup* H9812 digerida com 50U *XbaI* (Invitrogen - Life Technologies) durante 2 horas a 37°C. Após as corridas, os fragmentos foram corados por 30 minutos com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), descorados em água por 90 minutos, observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em software fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

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

A análise dos dados foi feita utilizando o *software* BioNumerics versão 7.6 (Applied Maths). Para a técnica de PFGE, somente as bandas entre 28,8 e 668,9 Kb em tamanho foram incluídas na análise. O marcador de peso molecular utilizado foi a linhagem *Salmonella Braenderup* H9812 digerida com 50U *XbaI* (Invitrogen - Life Technologies), como mencionado acima no item 4.8.5 foi utilizada como padrão de peso molecular, essa linhagem foi incluída três vezes em cada gel para normalizar as imagens e permitir comparações entre os diferentes géis.

4.8.7. Construção do dendrograma de similaridade genética

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

4.9. Índice de discriminação (DI)

O poder discriminatório de PFGE e ERIC-PCR foi avaliado pelo índice de diversidade de Simpson, conforme descrito por Hunter & Gaston (1988) que se baseia na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido através da seguinte fórmula:

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

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

4.10. Tipagem molecular por MLST

Um total de 50 linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes de humanos foram tipadas por MLST, estas amostras estão destacadas (*) no Apêndice I. Estes isolados foram escolhidos com base nos dendrogramas construídos a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR e PFGE (GONZALES et al., 2018). Os dendrogramas apresentaram dois *clusters* e isolados representativos destes dois grupos foram selecionadas de acordo com a presença de genes de virulência e perfis de resistência.

4.10.1 Amplificação dos genes *housekeeping*

O MLST foi realizado sequenciando-se sete genes *housekeeping* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*). Os *primers* para amplificação dos sete genes *housekeeping* e a temperatura de hibridação foram disponibilizados no banco de dados do MLST para *E. coli* (MLST Databases at Uow Warwick Medical School: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados gerais sobre os *primers* utilizados na amplificação dos genes *housekeeping* utilizados na técnica de *Multi-locus Sequence Typing* (MLST).

Gene	Seqüência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura de hibridação(°C)
<i>adh</i>	ATTCTGCTTGCGCTCCGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	54
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806	54
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	911	60
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932	60
<i>purA</i>	CGCGTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816	54
<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC TCGTGCAAATCTACGGACCGGA	780	58

As reações de amplificação foram realizadas para cada gene separadamente conforme descrito na Tabela 6.

As condições das reações de amplificação foram de desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 2 minutos.
- Hibridação dos *primers*: X°C por 1 minuto.
- Extensão: 72°C por 1 minuto.

Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 15 minutos. O termociclador utilizado foi o DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Life Technologies). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg.ml⁻¹ por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio Rad).

Tabela 6. Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos sete genes *housekeeping* utilizados na técnica do MLST.

Componentes	Volume (µL)	Concentração final
X Tampão “PCR Buffer” ^a	5	1X
10mM “dNTP Mixture” ^a	1	0,2 mM de cada dNTP
Primer forward b	2,5	25 pmol
Primer reverse ^b	2,5	25 pmol
50mM MgSO ₄ ^a	2	2 mM
DNA Genômico (10ng/µL)	5	50 ng
Taq DNA Polymerase “High Fidelity” (1U/µL)	1	1U
H ₂ O destilada ultrapura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50	-----

^a Produto da Life Technologies ^b Produto da Integrated DNA Technologies (IDT)

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, situado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em sequenciador automático de DNA ABI 3500xL *Genetic Analyzer Sequencer* (Applied Biosystems – Life Technologies). Ressalta-se que para cada uma das 50 linhagens tipadas por MLST, foram sequenciados os sete genes *housekeeping* e foram realizadas duas reações com cada um dos *primers forward* e duas reações com cada um dos *primers reverse*. Dessa forma, para cada um dos sete genes foram feitas quatro reações de amplificação para cada uma das 50 linhagens, o que totalizou 1.400 reações de sequenciamento.

4.10.2. Análise das sequências obtidas

Através dos eletroferogramas foi possível avaliar visualmente a qualidade das sequências. Para uma sequência ser considerada ótima, picos devem estar altos, agudos e regularmente separados, garantindo que a base nitrogenada registrada esteja correta. Após o

sequenciamento e análise visual da qualidade das sequências, cada conjunto de sequências de um mesmo gene e de uma mesma linhagem foi analisado individualmente, pelo programa ChromasPro versão 1.41 (Technelysium Pty Ltd). Pela análise dos eletroferogramas foram gerados *contigs*, ou seja, sequências sobrepostas do gene em questão, a fim de obter-se a sequência consenso para cada gene de cada linhagem sequenciada. Foram utilizadas sequências padrões dos genes *housekeeping*, disponíveis no banco de dados de *E. coli*, que serviram de molde para delimitar o tamanho (pb) das sequências. A delimitação do tamanho das sequências evitou a perda da qualidade das sequências obtidas, uma vez que é comum após o sequenciamento, obter-se sequências de má qualidade em suas extremidades.

O diagrama de similaridade genética foi construído através do programa *goEBURST* disponível online (<http://www.phyloviz.net/goeburst/>). O diagrama foi construído baseado no ST das linhagens de *S. flexneri* estudadas e das linhagens de *Shigella* spp. e *E. coli*. disponíveis no banco de dados. O programa *goEBURST* permitiu a análise conjunta das linhagens estudadas e das linhagens, de diversas localidades geográficas contidas no banco de dados possibilitando, assim uma análise global.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Genes de virulência

Todas as 130 linhagens estudadas (Tabela 2) apresentaram o gene *ipaH* (Tabela 7). Os genes *ial*, *sigA*, *iuc*, *virA* e *pic* foram encontrados em mais de 70% das linhagens estudadas. Além disso, os genes *sat* e *virF* foram encontrados em 48,5% e 57,7% das linhagens, respectivamente. Por outro lado, os genes *ipgD* (5,4%), *icsA* (10,0%), *virB* (14,0%), *ipaBCD* (27%), *sepA* (30,0%), *set1B* (30,0%), *set1A* (35,4%) e *sen* (36,0%) foram encontrados em menos de 40% das linhagens estudadas. As frequências de todos os 16 genes de virulência pesquisados estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência dos genes de virulência pesquisados em 130 linhagens de *Shigella flexneri* estudadas.

Genes plasmidiais	Total de linhagens (%)	Genes cromossomais	Total de linhagens (%)
<i>IpaH</i>	130 (100%)	<i>IpaH</i>	130 (100%)
<i>ial</i>	115 (88,5%)	<i>sigA</i>	107 (82,3%)
<i>virA</i>	95 (73,0%)	<i>iuc</i>	97 (74,6%)
<i>virF</i>	75 (57,7%)	<i>pic</i>	94 (72,3%)
<i>sen</i>	47 (36,0%)	<i>sat</i>	63 (48,5%)
<i>sepA</i>	39 (30,0%)	<i>set1A</i>	46 (35,4%)
<i>ipaBCD</i>	35 (27,0%)	<i>set1B</i>	39 (30,0%)
<i>virB</i>	18 (14,0%)		
<i>icsA</i>	13 (10,0%)		
<i>ipgD</i>	7 (5,4%)		

5.2. Ensaio de invasão e sobrevivência em células Caco-2

Todas as 50 linhagens de *S. flexneri* analisadas e destacadas (*) no Apêndice I apresentaram uma porcentagem de invasão e sobrevivência maior do que 40 % em células Caco-2 polarizadas (Figura 2). Vinte e nove (58%) linhagens de *S. flexneri* apresentaram porcentagens de invasão e sobrevivência, em células epiteliais Caco-2, maior ou igual à porcentagem apresentada pela *S. flexneri* ATCC 12022 (53,97%) em valores absolutos. Porém, apenas as linhagens 19/17 e 61/13 apresentaram porcentagens de invasão e sobrevivência de 90,42%, e a 91,48% respectivamente, e apresentaram diferença estatística quando comparadas a *S. flexneri* ATCC 12022.

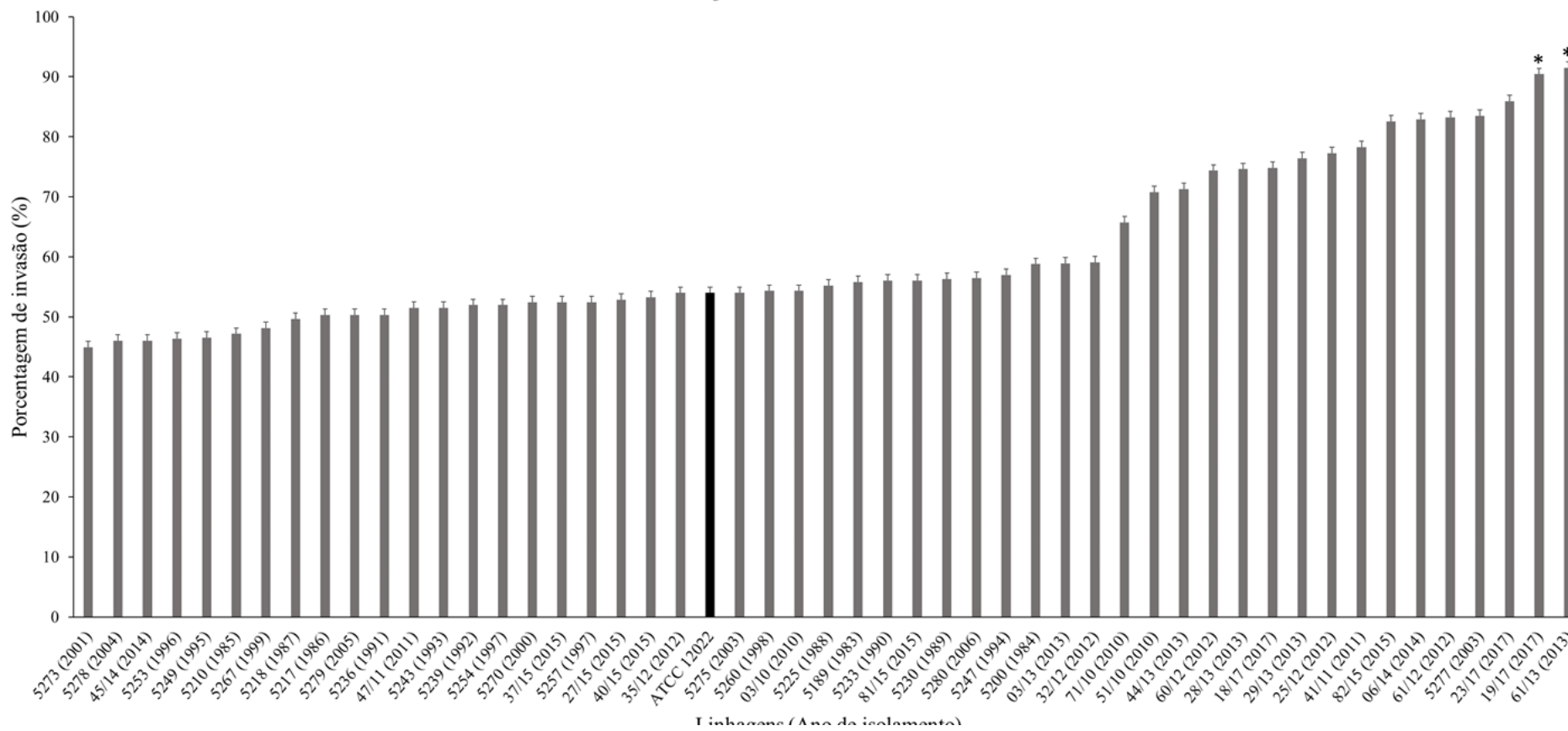
Invasão de *S. flexneri* em células Caco-2

Figura 2. Porcentagens de invasão e sobrevivência das 50 linhagens de *Shigella flexneri* analisadas e da linhagem referência *Shigella flexneri* ATCC 12022 em células epiteliais Caco-2.

5.3. Ensaio de sobrevivência em macrófagos U-937

Todas as 50 linhagens de *S. flexneri* analisadas e destacadas (*) no Apêndice I apresentaram uma porcentagem de invasão e sobrevivência igual ou maior do que 60% em macrófagos U-937 (Figura 3). Vinte e seis (52,0%) das 50 linhagens de *S. flexneri* estudadas apresentaram uma porcentagem de sobrevivência maior do que a linhagem referência *S. flexneri* ATCC 12022 (Figura 3). Entretanto, apenas as linhagens 5249 (88,37%), 03/13 (88,37%), 5253 (88,79%), 5267 (89,01%), 5279 (89,01%) e 28/13 (89,36%) apresentaram diferença estatística quando comparadas a *S. flexneri* ATCC 12022.

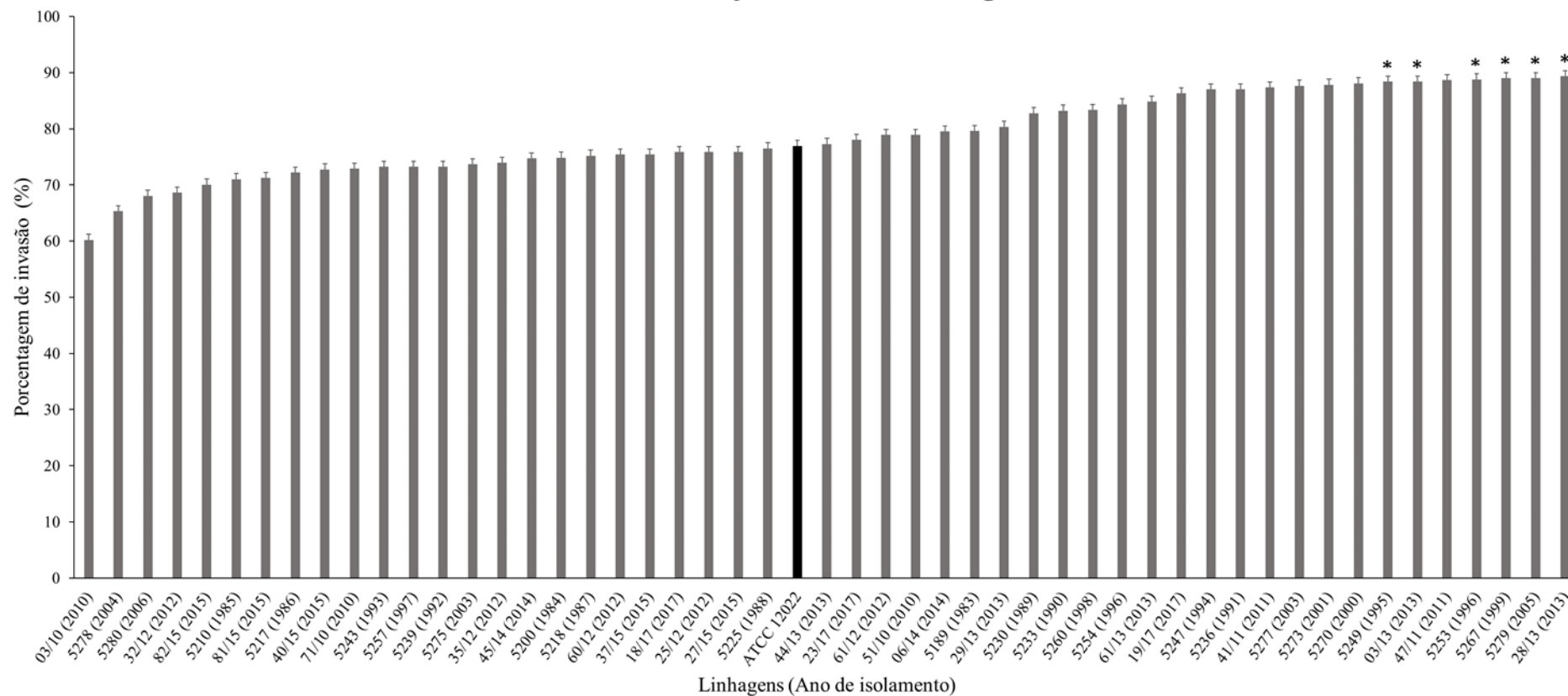
Sobrevivência de *S. flexneri* em macrófagos U937

Figura 3. Porcentagens de sobrevivência das 50 linhagens de *Shigella flexneri* analisadas e da linhagem referência *Shigella flexneri* ATCC 12022 em macrófagos humanos U-937.

5.4. Ensaio de virulência em larvas *Galleria mellonella*

Oito linhagens de *S. flexneri* foram analisadas e estão destacadas (£) no Apêndice I. Os controles do ensaio foram: a linhagem referência *S. flexneri* ATCC 12022, que foi aplicada em 10 larvas, o controle negativo, que corresponde a aplicação de PBS em 10 larvas e o “naïve”, que corresponde a outras 10 larvas sem aplicação de nenhum composto. As linhagens que causaram a maior porcentagem de mortalidade em *G. mellonella* foram: 27/15 (sem resistência a antimicrobianos) e 18/17 (MDR) após 10 dias, 70% e 60% das larvas, respectivamente.

Não foi observada correlação entre resistência ou sensibilidade a antimicrobianos e virulência. Entretanto, foi observado que as linhagens de *S. flexneri* isoladas de anos mais recentes, em 2015 e 2017 (27/15 e 18/17), causaram uma maior mortalidade das larvas em relação as linhagens mais antigas, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Figura 4).

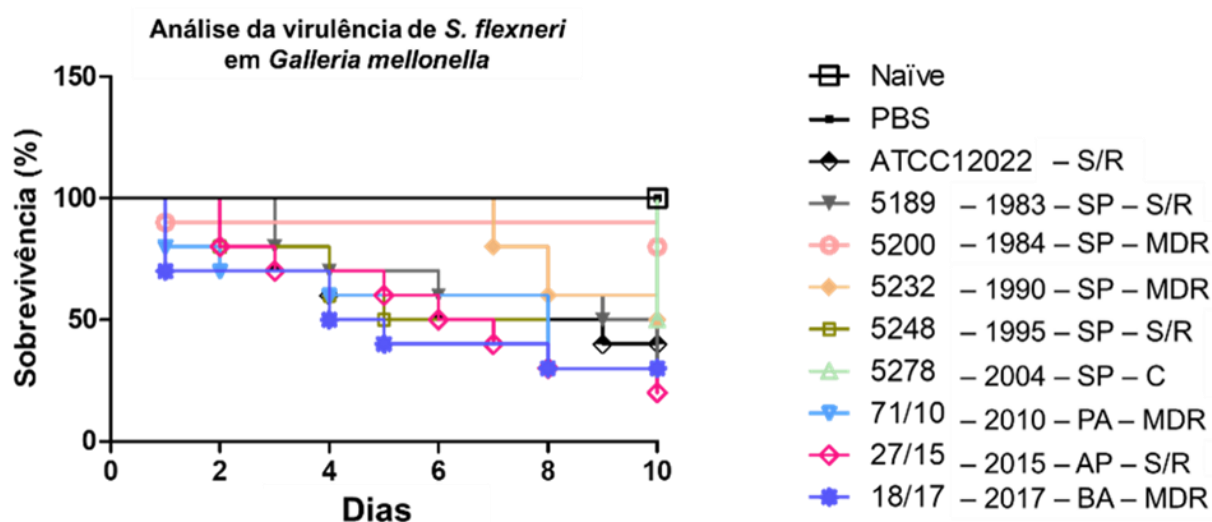


Figura 4. Análise de virulência das oito linhagens representativas de *Shigella flexneri* de diferentes décadas, Estados e com diferentes perfis de suscetibilidade/resistência a antimicrobianos em larvas de *Galleria mellonella* ao longo de 10 dias. Controles: Naïve (sem aplicação de nenhum composto), PBS e ATCC 12022 de *Shigella flexneri*. **Abreviações:** (SP) São Paulo, (PA) Pará, (AP) Amapá e (BA) Bahia. (S/R) sem resistência a antimicrobianos, (MDR) multidroga resistentes.

5.5. Resistência antimicrobiana

Todas as 130 linhagens de *S. flexneri* estudadas (Tabela 2 e Apêndice I) foram suscetíveis aos antimicrobianos ciprofloxacina, levofloxacina e ofloxacina. No entanto, 74 (57%) linhagens apresentaram resistência a tetraciclina, 70 (54%) apresentaram resistência a sulfametoxazol- trimetoprima e a resistência a ampicilina foi encontrada em 69 (53%) das

linhagens estudadas. Além disso, 56 (43%) das linhagens foram resistentes ao cloranfenicol (Tabela 8). O perfil de resistência mais frequentemente encontrado foi a tetraciclina (TE) e sulfametoxazol-trimetoprima (STX-TE), com 14 (10,7%) linhagens de *S. flexneri* estudadas apresentando esse perfil. Cinquenta e sete (43,8%) linhagens foram multidroga resistentes (MDR) (Figura 5 e Apêndice I).

Tabela 8. Frequência da resistência de 130 linhagens de *Shigella flexneri* estudadas a diferentes antimicrobianos

Classe de antimicrobianos	Antimicrobianos	Total de linhagens (%)
Carbapenêmicos	IMP	1 (0.7%)
Cefalosporinas	FEP	2 (1.5%)
	CAZ	4 (3%)
	CTX	5 (4%)
Quinolonas	CIP	–
	LVX	–
	OFLX	–
	NA	2 (1.5%)
Penicilinas	PIP	21 (16%)
	AMP	69 (53%)
Combinações de inibidores de β-lactamase	AMC	6 (4.6%)
	SAM	18 (14%)
Aminoglicosídeos	CN	2 (1.5%)
Tetraciclinas	TE	74 (57%)
Sulfametoxazol-trimetoprima	SXT	70 (54%)
Fenicóis	C	56 (43%)

Abreviações: IMP: Imipenem; FEP: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina; OFLX: Ofloxacina; NA: Ácido nalidíxico; PIP: Piperacilina; AMP: Ampicilina; AMC: Ácido clavulânico-amoxicilina; SAM: Sulbactam-ampicilina; CN: Gentamicina; TE: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprima; C: Cloranfenicol.

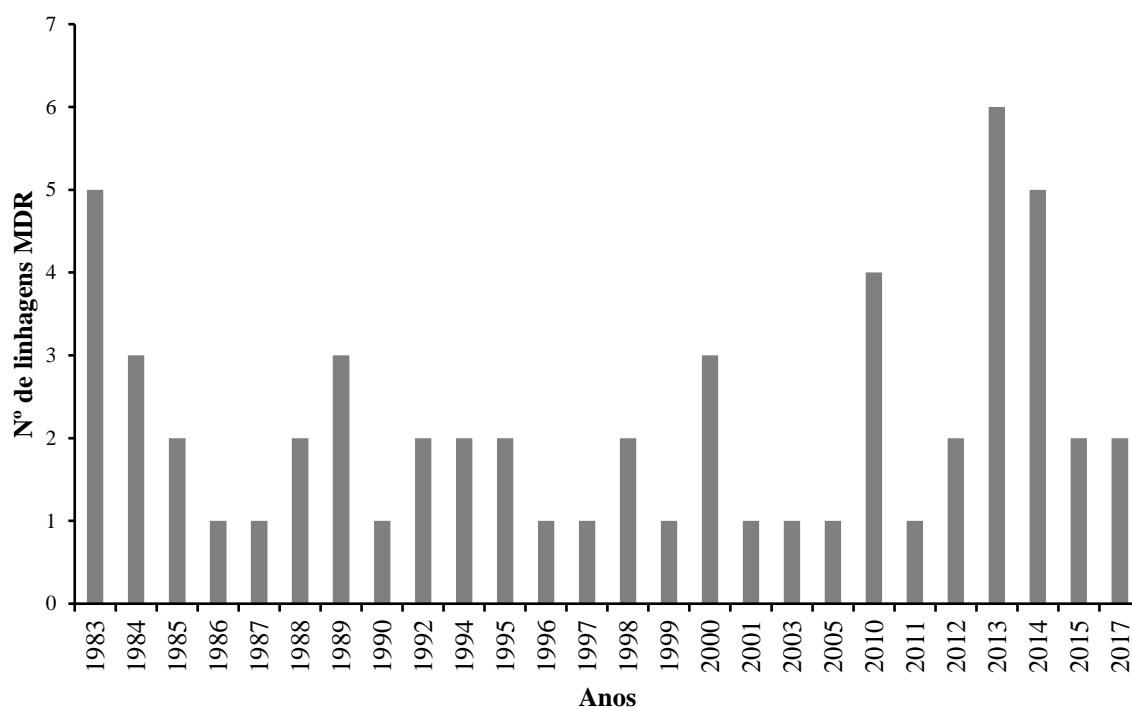
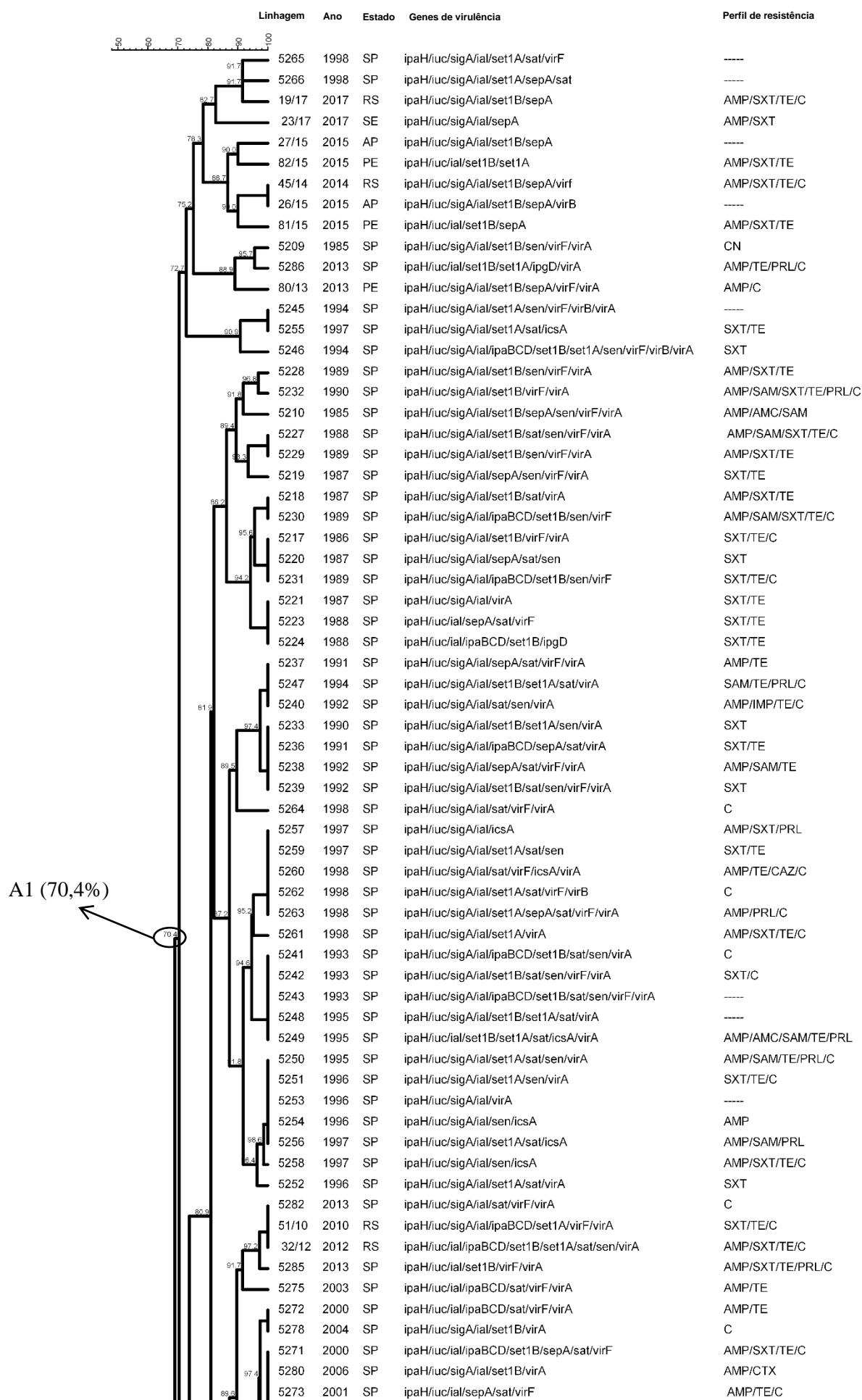


Figura 5. Frequência de 57 linhagens de *Shigella flexneri* multidroga resistentes (MDR) estudadas por 34 anos.

5.6. Tipagem molecular por ERIC-PCR

O dendrograma gerado por ERIC-PCR diferenciou as 130 linhagens de *S. flexneri* em 64 ERIC tipos e alocou as linhagens em dois *clusters* designados ERIC-A e ERIC-B com 47,8% de similaridade entre si (Figura 6). O *cluster* ERIC-A agrupou 122 linhagens isoladas da região Nordeste, dos Estados do Ceará, Pernambuco, Sergipe e Maranhão; da região Norte, dos Estados do Amapá, Pará e Rio Grande do Norte; da região Sudeste, dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, além de linhagens isoladas da região Sul, do Estado do Rio Grande do Sul, entre 1983 e 2017 com 61,1% de similaridade genética entre si. Especificamente, dentre estas 122 linhagens, um total de 96 linhagens ou aproximadamente 73,8% de todas as linhagens estudadas apresentaram $\geq 70,4\%$ de similaridade genética e foram alocadas em um subgrupo denominado ERIC-A1. O *cluster* ERIC-B reuniu oito linhagens isoladas dos Estados do Rio Grande do Sul, Maranhão, Bahia e São Paulo entre 1984 e 2017 com similaridade genética $\geq 48,8\%$ entre si.

ERIC-PCR



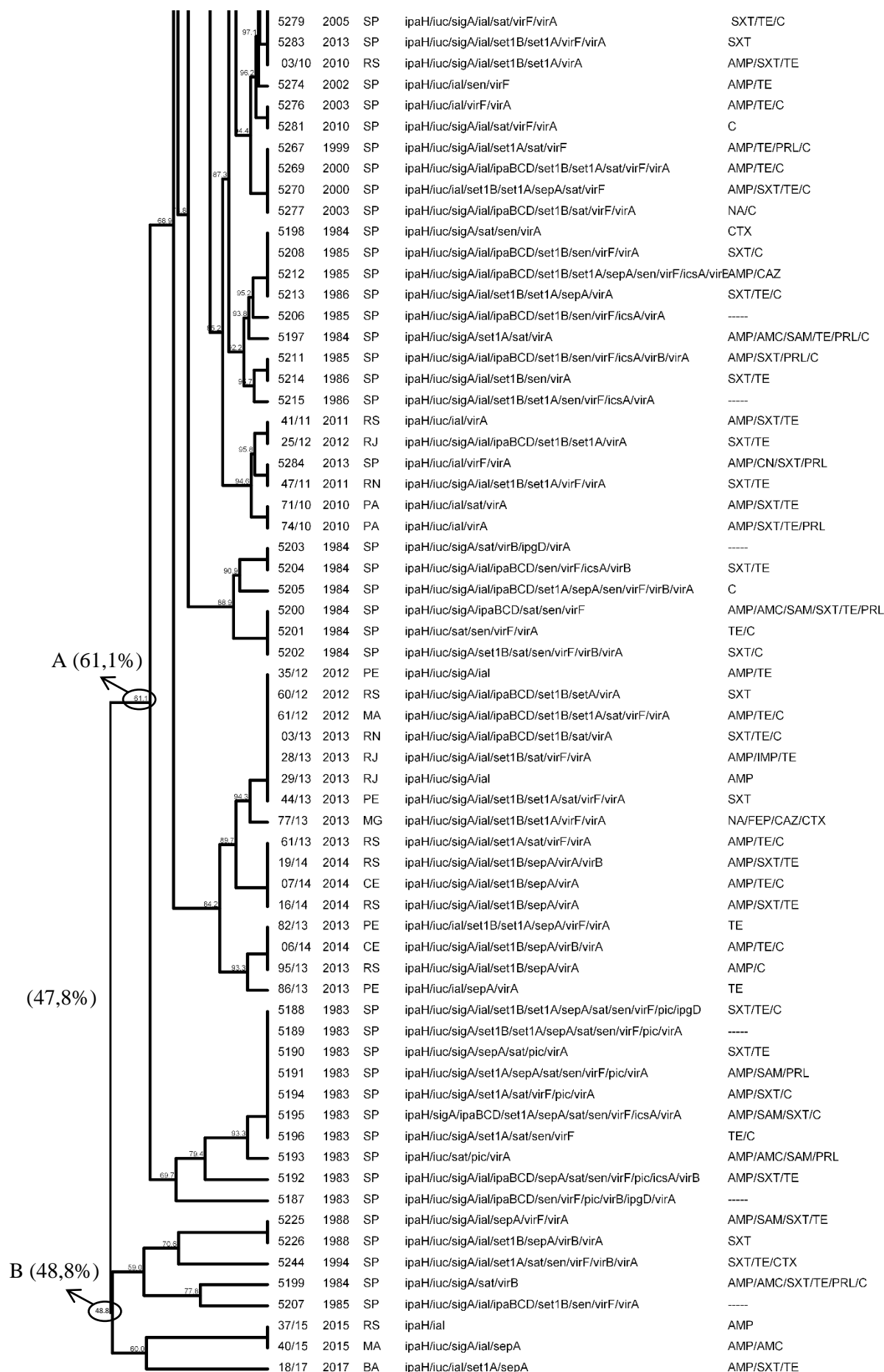
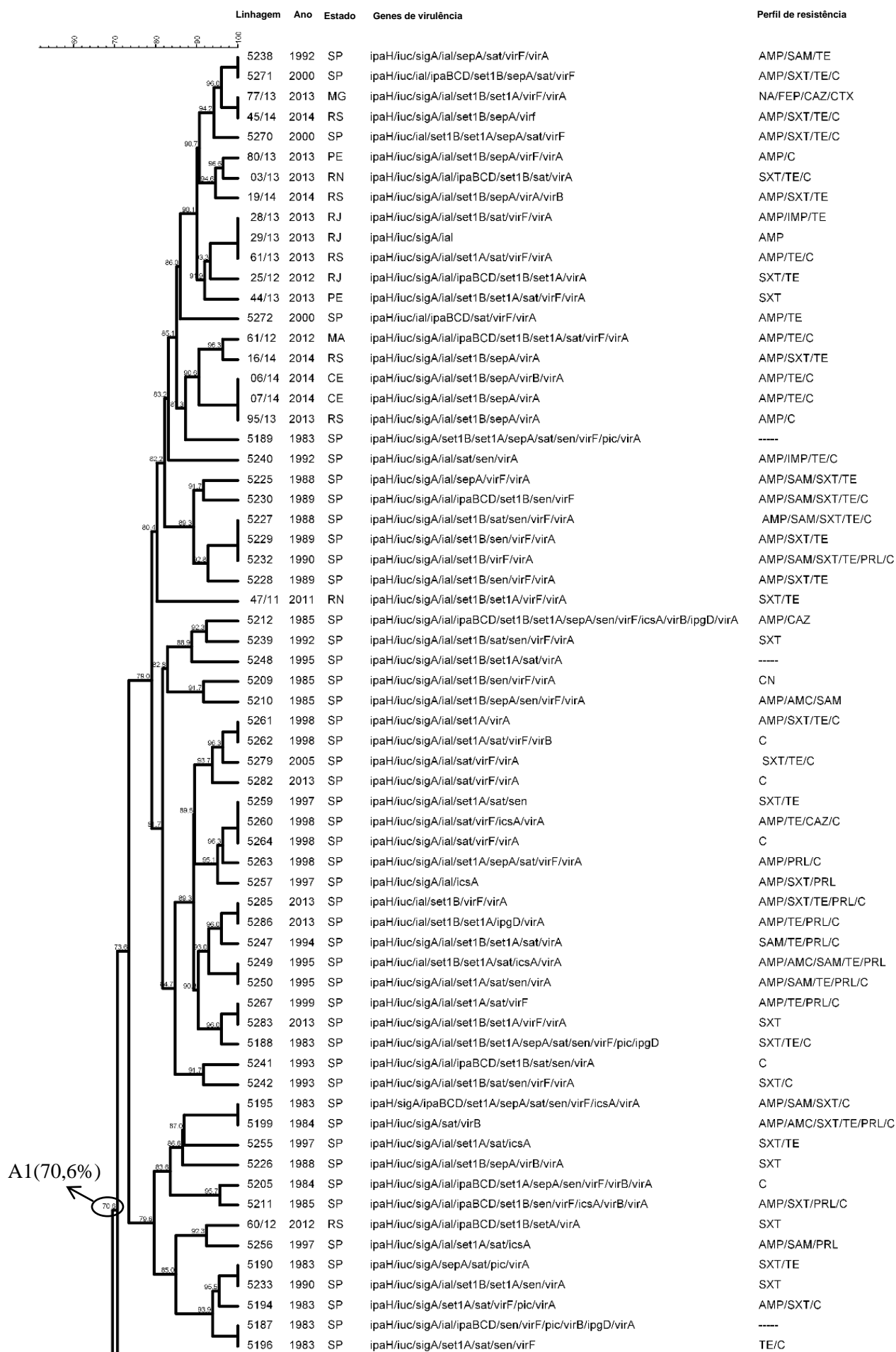


Figura. 6. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de fragmentos obtidos pela técnica ERIC-PCR para as 130 linhagens *Shigella flexneri* estudadas. A porcentagem de similaridade entre as linhagens está representada por números ao lado dos nós. **Abreviações dos Estados:** AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais, PA: Pará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SE: Sergipe; SP: São Paulo. **Abreviações dos antimicrobianos:** IMP: Imipenem; FEP: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina; OFLX: Ofloxacina; NA: Ácido nalidíxico; PIP: Piperacilina; AMP: Ampicilina; AMC: Ácido clavulânico-amoxicilina; SAM: Sulbactam-ampicilina; CN: Gentamicina; TE: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprima; C: Cloranfenicol.

5.7. Tipagem molecular por PFGE

O dendrograma gerado por PFGE diferenciou as 130 linhagens de *S. flexneri* em 110 PFGE tipos e alocou as linhagens em dois *clusters* designados PFGE-A e PFGE-B com 51,5% de similaridade entre si (Figura7). O grupo PFGE-A reuniu 120 linhagens isoladas da região Nordeste, nos Estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Sergipe e Maranhão; da região Norte, nos Estados do Amapá e Rio Grande do Norte; da região Sudeste, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, além de linhagens isoladas da região Sul, no Estado do Rio Grande do Sul, entre 1983 e 2017 com 57,4% de similaridade genética entre as linhagens. Especificamente, dessas 120 linhagens de *S. flexneri* um total de 74 linhagens ou 56,9% de todas as linhagens apresentaram similaridade acima de 70,6% entre si. O grupo PFGE-B foi composto por dez linhagens isoladas dos Estados de São Paulo, Pará e Rio Grande do Sul entre 1984 e 2011 com $\geq 65,6\%$ de similaridade genética.

PFGE



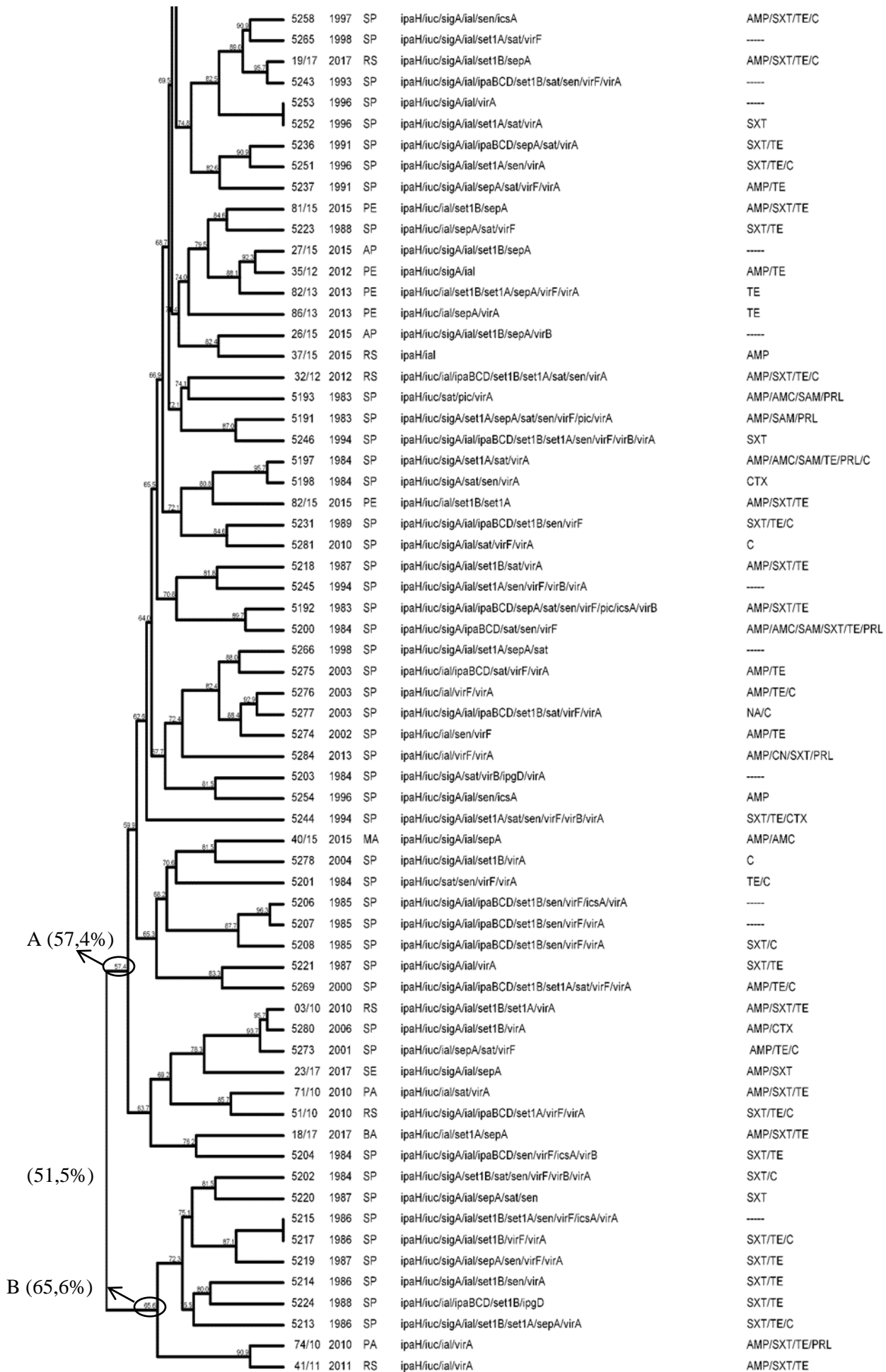


Figura 7. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de fragmentos obtidos pela técnica PFGE para as 130 linhagens *Shigella flexneri* estudadas. A porcentagem de similaridade entre as linhagens está representada por números ao lado dos nós. **Abreviações dos Estados:** AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais, PA: Pará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SE: Sergipe; SP: São Paulo. **Abreviações dos antimicrobianos:** IMP: Imipenem; FEP: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina; OFLX: Ofloxacina; NA: Ácido nalidíxico; PIP: Piperacilina; AMP: Ampicilina; AMC: Ácido clavulânico-amoxicilina; SAM: Sulbactam-ampicilina; CN: Gentamicina; TE: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprima; C: Cloranfenicol.

5.8. Índice de discriminação (DI)

O DI foi de 0,98 para ERIC-PCR e 0,99 para PFGE.

5.9. Tipagem molecular por MLST

5.9.1. Amplificação de genes *housekeeping*

Os sete genes *housekeeping* propostos no banco de dados de MLST para *E. coli* foram amplificados nas 50 linhagens de *S. flexneri* sublinhadas destacadas com um (*) no Apêndice I. Após a análise de corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, foi possível a observação dos fragmentos amplificados obtidos para cada gene, confirmando assim os seus respectivos tamanhos como mencionado no item 4.10.1 do Material e Métodos (Tabela 5).

5.9.2. Sequenciamento

Todas as sequências obtidas no presente estudo, referentes aos sete genes *housekeeping* para as 50 linhagens de *S. flexneri* selecionadas foram consideradas satisfatórias para análise. Após o alinhamento das duas sequências *forward* e duas sequências *reverse* para cada um dos sete genes de cada linhagem estudada, uma sequência consenso individual de cada linhagem foi obtida. A Figura 8 é representativa e ilustra esse alinhamento das sequências *forward* e *reverse* da linhagem de *S. flexneri* (5189) e a sequência de referência do gene *adk* encontrada no banco de dados.

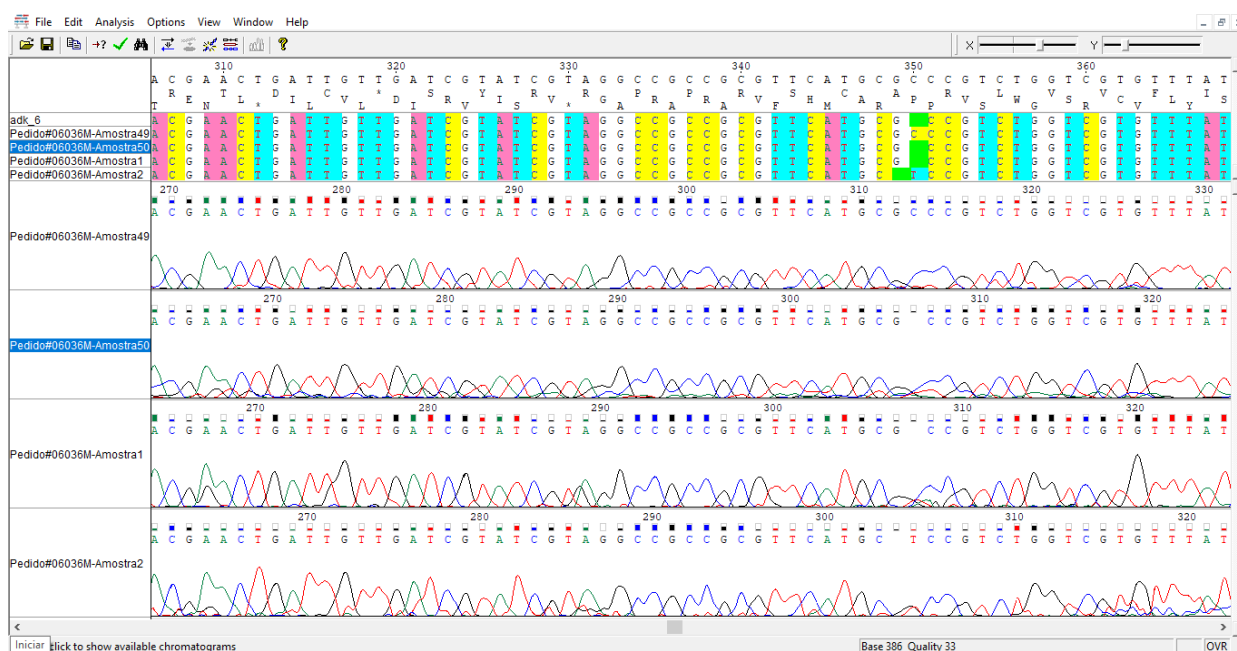


Figura 8. Alinhamento e análise de sequências do gene *adk* de uma linhagem representativa de *Shigella flexneri* estudada pelo programa ChromasPro.

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

Todas as 50 linhagens selecionadas para o MSLT apresentaram os seguintes alelos: 6 (*adk*), 61 (*fumC*), 6 (*gyrB*), 11 (*icd*), 13 (*mdh*), 3 (*purA*) e 50 (*recA*). A ordem desses alelos gerou o ST 245. Não foram observadas correlações entre o ST, frequência dos genes de virulência e o perfil de resistência entre as linhagens de *S. flexneri* estudadas (Apêndice I).

A Figura 9 traz o diagrama gerado com as 50 linhagens de *S. flexneri* e 9196 outras linhagens depositadas no banco de dados até 07/01/2022. Os STs classificados como *single locus variant* (SLV) foram noventa e nove: 240, 255, 259, 268, 627, 633, 651, 694, 1022, 1024, 2426, 5240, 5249, 5256, 5288, 5312, 5400, 5497, 5550, 5554, 5577, 5586, 5598, 5605, 5650, 5672, 5674, 6200, 6201, 6202, 6203, 6204, 6369, 6443, 6444, 6676, 6677, 6916, 6917, 6918, 6988, 7037, 7039, 7082, 7240, 7251, 7384, 7837, 7839, 7855, 8213, 8268, 8276, 8285, 8298, 8299, 8305, 8311, 8326, 8411, 8515, 8725, 8808, 8878, 8884, 9060, 9145, 9148, 9149, 9802, 9886, 9889, 10096, 10104, 10107, 10143, 10450, 10509, 10510, 10523, 10524, 10662, 10666, 10668, 10674, 10790, 10792, 10896, 11236, 11302, 11389, 11623, 11687, 11691, 11701, 12302, 12304, 12444 e 61382. Os STs classificados como *double locus variant* (DLV) foram dezessete linhagens: 264, 629, 631, 1753, 5283, 5556, 5570, 6139, 6367, 6368, 6446, 7838, 8299, 8339, 8507, 8893 e 9149. Ademais, os STs classificados como *triple locus variant* (TLV) foram quatro: 248, 5671, 10108 e 12460.

Anteriormente ao presente estudo, existiam apenas quatro linhagens de *S. flexneri* do Brasil depositadas no banco de dados como ST 245. Todas estas linhagens isoladas de fezes de humanos (< 2 anos), nos anos de 2007 e 2008 no Estado do Amazonas.

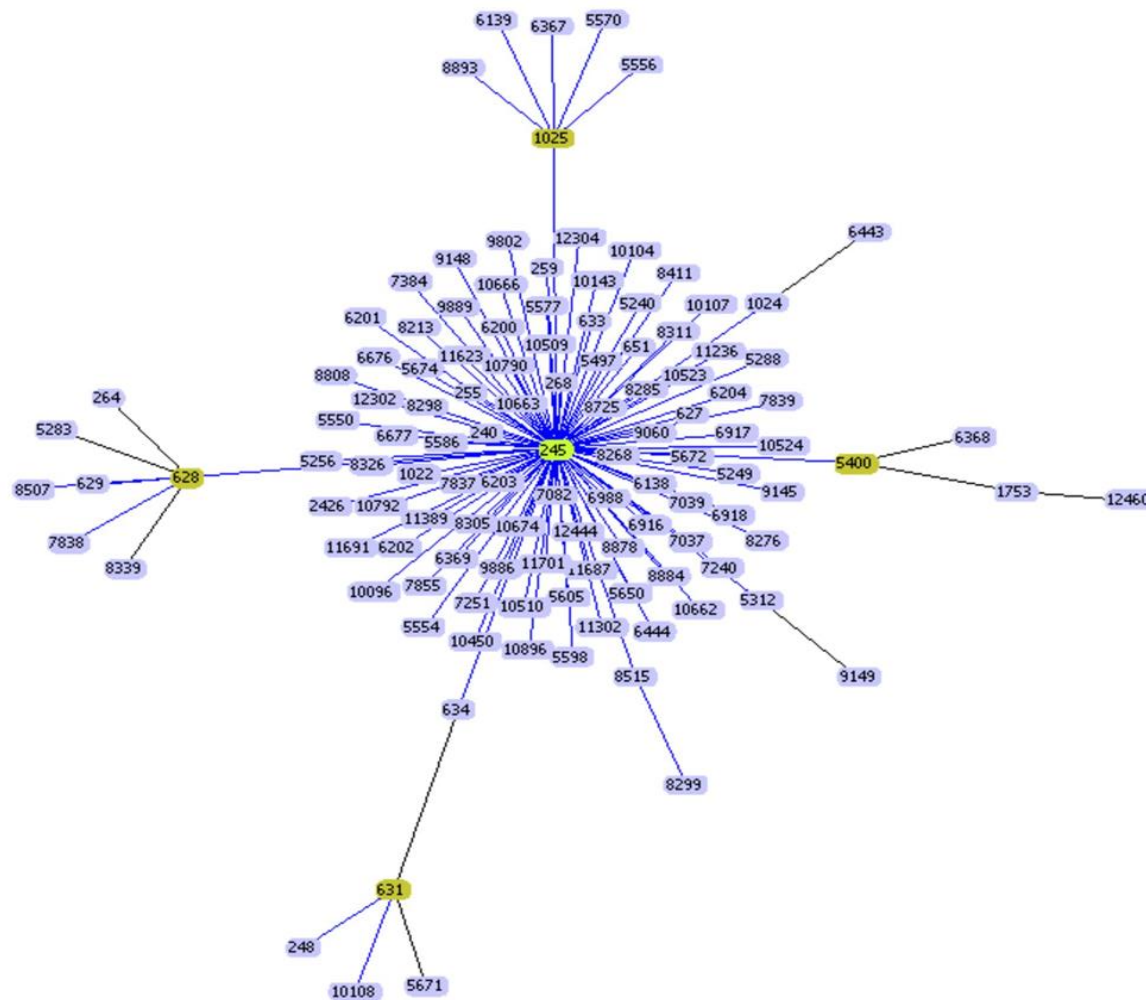


Figura 9. Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *GoEburst* com as 50 linhagens de *Shigella flexneri* selecionadas desse estudo e 9196 linhagens relacionadas depositadas no banco de dados até 03/10/2021. Todas as linhagens do presente estudo foram tipadas como ST245. Em verde estão os grupos *founders* (central de complexos clonais), em preto todos os outros STs do banco de dados.

6. DISCUSSÃO

Apesar da grande importância clínica de *Shigella flexneri* como agente causal de diarreia no Brasil, relativamente poucos estudos caracterizaram molecularmente e fenotipicamente um número expressivo de linhagens de *S. flexneri* isoladas por décadas no país (PENATTI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; PAULA et al., 2010; SOUSA et al., 2013; CRUZ et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018; GONZALES et al., 2020). O presente estudo analisou o potencial patogênico, o perfil de resistência a antimicrobianos e a diversidade genotípica de linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes diarreicas de humanos em um período de 34 anos em vários Estados do Brasil.

A estreita relação genética de *Shigella* spp. com *E. coli* permitiu a aplicação precoce das ferramentas genéticas utilizadas em *E. coli* para estudar mecanismos patogênicos de *Shigella* spp. Os mecanismos patogênicos de *Shigella* spp. são reproduzidos por vários outros patógenos bacterianos. A descoberta desses mecanismos patogênicos compartilhados acelerou o conhecimento e confirmou um dos conceitos fundamentais de evolução: quando um organismo encontra um caminho para a sobrevivência/adaptação em um novo ambiente, a seleção natural irá conduzir outros organismos ao longo do mesmo caminho ou de um caminho semelhante (LAMPEL et al., 2018). *Shigella* spp. e *E. coli* são geneticamente relacionados, porém são classificados em dois gêneros bacterianos distintos. Para diferenciá-los é feita a investigação do gene *ipaH*, presente apenas em *Shigella* spp. e testes bioquímicos (VAN DEN BELD & REUBSEAT, 2012).

Observamos uma alta frequência de genes de virulência nas 130 linhagens de *S. flexneri* estudadas. Todas as linhagens apresentaram o gene *ipaH* (Tabela 7). Os genes *ial*, *sigA*, *iuc*, *virA* e *pic* estavam presentes em mais de 70% das linhagens. Os genes *sat* e *virF* foram encontrados em 48,5% e 57,7% das linhagens, respectivamente. Por outro lado, os genes *ipaBCD*, *ipgD*, *icsA*, *virB*, *sepA*, *set1B*, *set1A* e *sen* foram encontrados em menos de 40% das linhagens estudadas (GONZALES et al., 2020). Assim como observamos em nossa pesquisa, estudos realizados no Peru, Bangladesh, China e Irã também encontraram o gene *ipaH* em 100% das linhagens de *S. flexneri* analisadas (ZANG et al., 2014; LLUQUE et al., 2015; RANJBAR et al., 2017; SHAHNAIJ et al. 2018).

Vale ressaltar que as frequências de alguns genes de virulência, como os genes *sat*, *pic* e *sepA* foram maiores em outros estudos realizados por Souza et al. (2013), Lluque et al. (2015) e Shahnaj et al. (2018) que analisaram linhagens de *S. flexneri* isoladas no Brasil, Peru e Bangladesh, respectivamente. É importante mencionar que a alta frequência do gene *sepA* foi observada nas linhagens de *S. flexneri* nos estudos acima mencionados, o que é um importante

indicador de aumento da gravidade clínica, uma vez que esse gene foi associado a dor abdominal intensa e a fezes com sangue (Medeiros et al., 2018). Além disso, Boisen et al. (2012) avaliaram as combinações de genes de virulência associados a infecções por *E. coli* enteroagregativas e encontraram forte associação entre a presença do gene *sepA* e diarreia. Frank e colaboradores (2011) observaram que o gene *sepA* estava presente no genoma de linhagens de *E. coli* produtora de toxina Shiga relacionada a um grande surto de síndrome hemolítico-urêmica na Europa. No presente estudo *sepA* foi encontrado em 30% das linhagens analisadas, o que demonstra o perfil patogênico de *S. flexneri* no país.

As frequências dos genes plasmidiais como *ipaH*, *ipaBCD*, *ial*, *sen*, *sepA*, *icsA*, *virB*, *virF*, *ipgD* e *virA* variou entre as linhagens estudadas. Sabe-se que a regulação do plasmídeo de virulência de *Shigella* é induzida a 37°C e reprimida a 30°C (SCHUCH & MAURELLI, 1997). Uma possível explicação para essa variação encontrada é que as linhagens do presente estudo são provenientes de uma coleção de bactérias mantidas à temperatura ambiente em um meio sólido, e assim esta instabilidade no ambiente de armazenamento pode ter proporcionado mutações e diferenças nas populações estudadas, bem como a perda do plasmídeo de virulência. Outra explicação para isso é a plasticidade plasmidial que ocorre naturalmente durante a evolução destas linhagens, através da migração de elementos genéticos móveis como *transposons* ou sequências de inserção (PILLA et al., 2017).

A literatura publicada no Brasil, contém alguns estudos que verificaram a presença de um pequeno número de genes de virulência em linhagens de *S. flexneri* isoladas de uma única região do país. Nenhum desses estudos incluiu linhagens isoladas por um longo período no país (SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2013; MEDEIROS et al., 2018). O presente estudo demonstrou a alta frequência de importantes genes de virulência em linhagens isoladas durante 34 anos em diferentes estados do Brasil destacando o potencial patogênico de linhagens de *S. flexneri* estudadas neste trabalho.

A linhagem de células Caco-2 é uma linhagem imortal de células epiteliais humanas heterogêneas de adenocarcinoma colorretal que podem ser invadidas por enterobactérias como *S. flexneri* (FOGH & TREMPÉ, 1975; MOUNIER et al., 1992). As células epiteliais Caco-2 estão entre os modelos celulares mais utilizados para estudar a habilidade de enterobactérias de invadir as células no intestino humano (GANAN et al., 2010).

No presente estudo as 50 linhagens de *S. flexneri* analisadas apresentaram uma porcentagem de invasão e sobrevivência maior do que 40% em células Caco-2 (Figura 2). Vinte e oito (53,9%) destas linhagens apresentaram porcentagens de invasão e sobrevivência, em células epiteliais Caco-2, maior ou igual à porcentagem apresentada pela ATCC 12022 que foi

de 53,9% (Figura 2). Não houve diferença estatística significativa entre as linhagens e a *Shigella* ATCC 12022 com exceção de duas linhagens: 19/17 (90,4%) e 61/13 (91,4%).

S. flexneri é responsável por causar um processo inflamatório que pode ocasionar danos à mucosa do cólon e morte celular por necrose e apoptose (LIMA et al., 2013). Por conta desse eficaz mecanismo patogênico podemos observar no presente estudo uma alta porcentagem de invasão em células Caco-2 (> 40%). *S. flexneri* precisa ter acesso à superfície epitelial para colonizá-la, romper essa barreira e invadir a mucosa, bem como superar os mecanismos de defesa do hospedeiro que são desencadeados por seu comportamento agressivo (SANSONETTI, 2004). *S. flexneri* possui um poderoso sistema de secreção do tipo III usado para penetrar tipos de células não fagocíticas como enterócitos e hepatócitos (BUKHOLM et al., 1986; GALAN & COLLMER, 1999, MOUNIER et al., 1992).

Em um estudo de Lima e colaboradores (2013) realizado no Brasil, foi analisada a capacidade de uma linhagem de *S. flexneri* 2a de invadir hepatócitos de ratos e células Caco-2 em microambientes normóxicos e hipóxicos, bem como provocar alterações morfológicas e fisiológicas nestas células após infecção sob hipóxia. Os resultados mostraram que havia menos bactérias nas células Caco-2 do que nos hepatócitos em condições normóxicas e hipóxicas. Foi observado também que quanto maior a multiplicidade de infecção (MOI), maior a recuperação de *S. flexneri* nas duas linhagens celulares, mesmo em diferentes condições de oxigênio (LIMA et al., 2013).

Moreno e colaboradores (2009) também obtiveram uma grande recuperação de *S. flexneri* em células Caco-2, e observaram que quanto maior o tempo de incubação das bactérias com as células maior foi a porcentagem de invasão e expressão de genes de virulência. Nesse estudo realizado no Brasil foi feita uma comparação da capacidade de causar doença entre uma linhagem de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) O124:H⁻ e uma linhagem de *S. flexneri* 5a. Observou-se que *S. flexneri* induziu uma resposta pró-inflamatória mais pronunciada, enquanto EIEC induziu uma forma leve da doença. EIEC mostrou uma disseminação célula a célula Caco-2 significativamente menos eficiente quando comparada com *S. flexneri*. Também houve comparativamente uma menor expressão de genes de virulência por EIEC durante a infecção de células Caco-2 (MORENO et al., 2009).

O recrutamento de leucócitos para locais inflamatórios é essencial para a geração de respostas adequadas de defesa do hospedeiro. Uma sequência de interações entre os leucócitos e células endoteliais, que são controladas por citocinas e substâncias quimioatraentes secretadas pelas células endoteliais ativadas, tecido conjuntivo e microrganismos invasores são necessárias

para que o recrutamento de leucócitos ocorra (DE COUPADE et al., 2003; EBNET; VESTWEBER, 1999).

A U-937 é uma linhagem celular, derivada de derrames pleurais de um paciente com linfoma, semelhante ao monócito humano. Fenotipicamente essas células são caracterizadas como pequenas, com núcleo grande arredondado ou em forma de rim e não aderentes. Estudos recentes demonstraram que quando as células U-937 são tratadas com sobrenadantes de culturas de linfócitos humanos, interferon- β ou *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) se diferenciam em células semelhantes a macrófagos (KOREN et al., 1979; PIKE et al., 1980).

No ensaio de sobrevivência em macrófagos humanos U-937, 35 linhagens das 50 linhagens de *S. flexneri* estudadas apresentaram uma porcentagem de invasão e sobrevivência de valor igual ou maior a 60% demonstrando uma alta capacidade de sobrevivência das linhagens estudadas frente a células de defesa do hospedeiro humano (Figura 3). Seis linhagens de *S. flexneri* (5249, 03/13, 5253, 5267, 5279 e 28/13) isoladas de fezes de humanos de diferentes locais em diferentes décadas foram as únicas que apresentaram porcentagem de invasão significativamente maiores que a *Shigella* ATCC 12022, contudo, 26 linhagens apresentaram porcentagem de invasão similares a linhagem referência (Figura 3).

Em um estudo realizado no Japão por Nonaka e colaboradores (1999) com uma linhagem de *S. flexneri* YSH6000 (tipo selvagem) e N1411 (mutante não virulento sem o gene *ipaBCD*) constatou-se que a infecção da linhagem selvagem de *S. flexneri* em células U-937 resulta em morte celular devido à rápida indução de necrose. O mecanismo pode envolver a formação de poros na membrana plasmática das células infectadas, que depende de genes de virulência como *ipaBCD*. Já outros tipos celulares podem sofrer apoptose por conta da infecção por *Shigella* spp. Essas observações demonstram que *Shigella* spp. possui capacidade de controlar a maneira como mata as células hospedeiras. Esta habilidade desempenha um papel crucial no início de infecção, sobrevivência e fuga da bactéria às respostas imunológicas do hospedeiro (NONAKA et al., 1999).

Pasqua e colaboradores (2019) demonstraram que após a infecção por *S. flexneri*, o citosol do macrófago sofre uma leve redução do *pH* intracelular, permitindo que a ativação do operon *emrKY* que ativa a bomba de efluxo que possui um papel fundamental durante o processo invasivo de *Shigella* spp.

Bando e colaboradores (2010) fizeram um estudo no Brasil comparando as interações de uma linhagem EIEC (O124: H⁻) e de uma linhagem de *S. flexneri* 5a M90T (invasiva) com células J774 semelhantes a macrófagos em cultura. Os resultados mostraram que *S. flexneri* causou maior mortalidade de macrófagos mais rapidamente e mais intensamente do que EIEC.

Ambos os patógenos induziram produção significativa de TNF, IL-1 e IL-10 por macrófagos após 7 horas de infecção. Os níveis de transcrição do antígeno-C do plasmídeo de invasão foram mais baixos em EIEC do que em *S. flexneri* ao longo do curso da infecção; demonstrando a menor virulência de EIEC em comparação com *S. flexneri*.

As larvas de *G. mellonella* são facilmente cultivadas em grande número a baixo custo e apresentam células e compostos da resposta imune inata muito semelhantes ao dos humanos (TSAI et al., 2016). É importante mencionar que ocorre a melanização de insetos como *G. mellonella* quando este é infectado por um patógeno, com a deposição de melanina para encapsular os agentes infecciosos no local da inoculação (TANG, 2009). Portanto, este processo é estimulado pela presença de bactérias e fungos, iniciando uma cascata de serina protease responsável pela ativação da fenoloxidase que catalisa a formação de melanina (TANG, 2009; TSAI et al., 2016).

Nos ensaios de virulência de *S. flexneri* em larvas de *G. mellonella* neste presente estudo, não se pode observar uma correlação entre resistência ou sensibilidade a antimicrobianos e virulência. Entretanto, foi observado que as linhagens de *S. flexneri* isoladas de anos mais recentes levaram a uma maior mortalidade das larvas em comparação as linhagens isoladas em datas mais antigas, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Figura 4).

Barnoy e colaboradores (2017) observaram que a taxa de mortalidade das larvas era dependente da linhagem de *Shigella* spp., da dose infecciosa e da presença do plasmídeo de virulência. Este estudo foi realizado nos Estados Unidos com onze linhagens de diferentes subgrupos de *Shigella* spp. e foi proposto o desenvolvimento deste modelo *in vivo* informativo e rápido para avaliar a virulência e a interação de *Shigella* com células da imunidade inata do inseto (BARNOY et al., 2017)

Barnoy et al. (2017) observou que a linhagem de *S. flexneri* 2a selvagem, persistiu e se replicou dentro das larvas, resultando na morte de células hemocitárias, enquanto as linhagens mutantes foram rapidamente eliminadas. A análise histológica das larvas infectadas em conjunto com fluorescência, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão indicou que *S. flexneri* se proliferou dentro de um vacúolo do inseto que estruturalmente se assemelham a vacúolos humanos. Alguns desses vacúolos carregados de bactérias tinham membranas duplas características de autofagossomos. Esses resultados sugerem que larvas de *G. mellonella* podem ser usadas como um modelo animal de fácil utilização para entender a patogênese da *Shigella* spp. que não requer procedimentos que consomem tempo e trabalho típicos de outros modelos.

Em conjunto, os resultados da frequência dos genes de virulência, invasão em células Caco-2, sobrevivência em macrófagos U-937 e em larvas *G. mellonella* reforçam o potencial patogênico das linhagens de *S. flexneri* analisadas no presente estudo.

O aumento da resistência antimicrobiana em linhagens de *Shigella* spp. vindo sendo relatado em todo o mundo (IZUMIYA et al., 2009; BASTOS & LOUREIRO, 2011; NUNES et al., 2012; GONZALEZ-TORRALBA et al., 2015; SERIBELLI et al., 2016). Em 2016 a ONU realizou uma Assembleia Geral reunindo líderes de 193 países, que assinaram um acordo no qual se comprometeram a combater a proliferação da resistência aos antibióticos. Estima-se que mais de 700 mil pessoas morram a cada ano devido a infecções por bactérias resistentes a drogas, porém acredita-se que este número possa ser muito maior, pois não existe um sistema global para o monitoramento destas mortes (THE GUARDIAN, 2016).

Neste trabalho, 116 (89,2%) linhagens de *S. flexneri* estudadas foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados (Tabela 8). Observamos altas taxas de resistência aos antibióticos de uso clínico como tetraciclina (57%), sulfametoxazol-trimetoprima (54%), ampicilina (53%) e cloranfenicol (43%) entre as linhagens estudadas (GONZALES et al., 2020). Dado este que corrobora com o com outros estudos de outras partes do mundo.

Vubil et al. (2018) avaliaram a resistência a antimicrobianos em 67 linhagens de *Shigella* spp. isolados de fezes de crianças com menos de 5 anos no distrito de Manhíça, sul de Moçambique, de 2007 a 2012. Foi observado um alto nível de resistência antimicrobiana à ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprima entre os isolados analisados, sendo *S. flexneri* muito mais resistente em relação a todas as outras espécies. Esse cenário levou ao uso de antibióticos de nova geração, como as fluoroquinolonas, embora resistência a esses agentes também tenha sido relatada (AZMI et al., 2014). Em nosso estudo, não encontramos resistência às fluoroquinolonas. No entanto, encontramos um número baixo de linhagens (1,5%) resistentes ao ácido nalidíxico (Tabela 8). Estudos têm demonstrado que a resistência ao ácido nalidíxico pode levar à redução da suscetibilidade às fluoroquinolonas (PEIRANO et al., 2006; DE PAULA et al., 2010; CARRARI et al., 2012; NUNES et al., 2012; SOUSA et al., 2013; QIN & GU, 2018).

Além disso, constatamos que 43,8% das 130 linhagens estudadas eram MDR, o que foi aumentando ao longo dos anos deste estudo (Figura 5). Especificamente, antes da década de 2000, 37,6% das linhagens de *S. flexneri* estudadas eram MDR e, após este período, 52,8% das linhagens eram MDR (GONZALES et al., 2020). O estudo de Vubil et al. (2018) com linhagens de *Shigella* spp. isoladas em Moçambique mostrou que a maioria dos isolados MDR eram de *S. flexneri* (47,7%) em comparação com 7,4% de outras espécies do gênero.

No Brasil, Sidrim et al. (1998), estudaram a resistência de 26 linhagens de *S. flexneri* isoladas no Nordeste do Brasil, no período de 1989 a 1993, e observaram que todas as linhagens estudadas eram MDR. Penatti et al. (2007) mostraram que 90% das 30 linhagens de *S. flexneri* isoladas em Campinas, Estado de São Paulo, Brasil eram MDR. Bastos e colaboradores (2010) observaram que 100% das 32 linhagens de *S. flexneri* isoladas de membros da população com faixas etárias de 6 meses a 81 anos, da cidade de Belém, Estado do Pará, no período de 1990 a 2000 apresentaram resistência a cefalotina, cefazolina, cefuroxima, axetilcefuroxima e tobramicina. Bastos & Loureiro (2011) fizeram o isolamento de 81 linhagens de *S. flexneri* de fezes diarreicas de indivíduos com poucos meses de vida até 80 anos de idade, no Estado do Pará. Estas linhagens apresentaram um padrão de resistência múltipla a ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina.

Dados de linhagens de *S. flexneri* têm mostrado maior taxa de resistência antimicrobiana em comparação com *S. sonnei*, o que é preocupante, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil onde *S. flexneri* é prevalente (CVE, 2009; GONZALES et al., 2020). A rápida emergência de linhagens MDR de *S. flexneri* se deve em grande parte à sua capacidade de adquirir e disseminar genes exógenos associados a elementos genéticos móveis, como transposons, integrons, plasmídeos e outras ilhas genômicas (ROWE-MAGNUS et al., 2002). Programas de vigilância são necessários para monitorar a resistência antimicrobiana e fornecer informações para orientar o manejo clínico (LIMA et al., 2015). Neste sentido, os dados do presente estudo apresentaram uma alta porcentagem de linhagens MDR de *S. flexneri* isoladas em diferentes Estados do país o que é um importante alerta às autoridades sanitárias do Brasil.

A diversidade genotípica das 130 linhagens de *S. flexneri* foi avaliada por ERIC-PCR e PFGE. O dendrograma gerado com dados ERIC-PCR demonstrou que o subgrupo ERIC-A1 compreendeu 96 (73,8%) linhagens isoladas dos Estados do Pará, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo, Sergipe, Amapá e Pernambuco, entre 1984 e 2017 com similaridade de 70,4% (Figura 6). Especificamente, 75 linhagens desse subgrupo apresentaram > 80,9% de similaridade entre si. Este fato sugere que apesar da distância geográfica entre os locais de isolamento das linhagens estudadas; mostraram-se geneticamente relacionados e descendentes de um subtipo prevalente (GONZALES et al., 2020).

Em contraste, Penatti e colaboradores (2007) analisaram 30 linhagens de *S. flexneri* isoladas da região metropolitana de Campinas, no Estado de São Paulo na região Sudeste do Brasil utilizando a técnica de ERIC-PCR e foi encontrado que todas as linhagens foram agrupadas em três principais grupos, sem a presença de um *cluster* predominante. Seribelli e

colaboradores (2016) analisaram 72 linhagens de *S. sonnei* que foram agrupadas em dois *clusters* tanto pela técnica de ERIC-PCR quanto por PFGE, apresentando mais de 80% de similaridade entre as linhagens de cada *cluster*, o que sugere a presença de dois subtipos prevalentes de *S. sonnei* no Estado de São Paulo, Brasil.

Existem poucos estudos que tiparam molecularmente linhagens de *S. flexneri* no mundo por ERIC-PCR (PENATTI et al., 2007; AHMED et al., 2013; LIU et al., 2017; ZAMANLOU et al., 2018; GONZALES et al., 2020). Apenas dois desses estudos foram realizados com linhagens isoladas no Brasil (PENATTI et al., 2007; GONZALES et al., 2020). Em geral, os estudos mostraram que as linhagens de *S. flexneri* isoladas de diferentes anos se agruparam em *clusters* distintos sem um subtipo prevalente.

A formação de vários subgrupos também está presente nesses estudos, o que demonstra que ERIC-PCR possui uma alta capacidade de diferenciar as linhagens dessa espécie. Assim como em nosso estudo, Kosek et al. (2012) tipou 97 linhagens de *S. flexneri* isoladas no Peru por ERIC-PCR, os isolados foram alocados em nove grupos distintos. Zamanlou et al. (2018) tipou 73 linhagens de *S. flexneri* isoladas de fezes de pacientes que sofriam de gastroenterite no Irã, e essas foram agrupadas em seis *clusters*. Como já mencionado, no estudo de Penatti et al. (2007) 30 linhagens de *S. flexneri* isoladas na região Sudeste do Brasil foram agrupadas em três *clusters* por ERIC-PCR com 30% de similaridade genética entre si.

Além da metodologia de ERIC-PCR possuir um alto poder de discriminação, esta também forneceu informações epidemiológicas consistentes, como foi demonstrado por Ranjbar et al. (2010) que analisaram linhagens de *S. flexneri* de um surto de shigelose em uma prisão no Irã e estas linhagens foram agrupadas em um mesmo *cluster*, indicando que uma única linhagem foi responsável por esse surto.

Corroborando com os dados gerados por ERIC-PCR, o dendrograma gerado pelos dados PFGE deste presente estudo agrupou a maioria das linhagens em um *cluster* principal. O grupo PFGE-A agrupou 120 linhagens, dentre essas linhagens 74 estavam presentes no subgrupo PFGE-A1 com mais de 70% de similaridade entre si (Figura 7). Portanto, os resultados do PFGE sugerem que haja um possível subtipo prevalente de *S. flexneri* que pouco se diferenciou genotipicamente e que prevaleceu contaminando humanos durante 34 anos em diferentes Estados do Brasil (GONZALES et al., 2020).

Os dados gerados pelas análises de PFGE em nosso estudo corroboram os achados de alguns outros estudos que também demonstraram que a maioria das linhagens de *S. flexneri* de outros países foram agrupadas em um único *cluster*, indicando que as linhagens descendem de um subtipo comum (SHAHNAJI et al., 2018; VUBIL et al., 2018; WILMER et al., 2015; YE

et al., 2010). No estudo de Ye et al. (2010) $\geq 30\%$ de 655 linhagens de *S. flexneri* da China foram agrupadas em um único *cluster*. Shahnaji et al. (2018) agrupou as 65 linhagens de Bangladesh em um único *cluster* com uma similaridade $\geq 80\%$.

Existem poucos estudos que caracterizaram molecularmente *S. flexneri* pela técnica de PFGE no Brasil e esses estudos não são recentes. Lima e colaboradores (1997) caracterizaram molecularmente 26 linhagens de *S. flexneri* de indivíduos residentes da cidade de Fortaleza, capital do Estado do Ceará, nordeste do Brasil com auxílio da técnica de PFGE, que identificou seis grupos distintos de *S. flexneri* circulando entre os indivíduos durante os 45 meses do estudo (1989 a 1993).

Angelini e colaboradores (2009) utilizaram a técnica de PFGE para investigar a epidemiologia molecular de 119 linhagens de *Shigella* spp., sendo 58 *S. sonnei* e 61 *S. flexneri* isoladas de casos de shigelose ocorridos nas regiões metropolitanas de Ribeirão Preto e Campinas, no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Os resultados indicaram a existência de poucos *clusters* formados por linhagens destas duas espécies analisadas com alta variabilidade genética entre estes grupos. Foram agrupadas em cada *cluster* ou subcluster linhagens das duas regiões metropolitanas, o que poderia sugerir a transmissão de linhagens entre as duas áreas, com introdução de diferentes genótipos.

As metodologias ERIC-PCR e PFGE foram eficientes e discriminaram de forma muito semelhante as linhagens de *S. flexneri* estudadas de acordo com o índice de discriminação (ID), indicando que mesmo organismos monomórficos como *Shigella* spp. podem ser bem discriminados por essas técnicas (GONZALES et al., 2020). Além disso, ambos os métodos forneceram informações epidemiológicas consistentes e concordantes, isto é, sugerem a predominância de um *cluster* composto por linhagens de *S. flexneri* geneticamente relacionadas, isoladas por 34 anos no Brasil (Figuras. 6 e 7). É importante mencionar que não foram observadas diferenças na frequência dos genes de virulência e/ou nos perfis de resistência de acordo com os grupos de ERIC-PCR e PFGE (GONZALES et al., 2020).

Segundo Urwin e Maiden (2003), o método de MLST foi proposto em 1998 com o intuito de se estudar a evolução e a genética populacional de diferentes patógenos. Todas as 50 linhagens selecionadas para a análise por MSLT foram classificadas como ST245. Não foram observadas correlação entre o ST, frequência dos genes de virulência e o perfil de resistência entre as linhagens de *S. flexneri* estudadas (Apêndice I). A técnica de MLST apresentou um baixo potencial discriminatório no presente estudo. Choi e colaboradores (2007) utilizaram a mesma técnica para tipar 107 linhagens de *S. flexneri* coletadas na Coreia, China, Filipinas,

Cingapura, Sri Lanka e Taiwan e estas foram alocadas no grande complexo clonal ST245, exceto o sorotipo 6 que foi alocado no complexo ST243.

Shahsavani e colaboradores (2016) observaram que as seis linhagens *S. flexneri* multirresistentes isoladas durante um período de um ano de crianças com diarreia em Teerã, Irã foram identificadas como ST 245. Chattaway et al. (2017) tiparam 350 linhagens de *S. flexneri* cedidas pelo *Gastrointestinal bacteria reference unit* (GBRU), laboratório de referência para patógenos gastrointestinais da Inglaterra. As linhagens de *S. flexneri* dos sorotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4c, X e Y) pertenciam ao complexo clonal 245 (n= 322). Os isolados de *S. flexneri* do sorotipo 6 (n=28) pertenciam ao ST145 dentro do complexo clonal 145. Porém sabe-se o sorotipo 6 de *S. flexneri* foi identificado erroneamente e está mais relacionado ao *S. boydii* (CONNOR et al., 2015; SLOPEK & MULCYK, 1967).

Cao e colaboradores (2012) utilizaram o MLST entre outras técnicas de tipagem molecular para caracterizar linhagens de *Shigella* spp., por mais de duas décadas em Tianjin, na China. Os resultados de MLST dividiram as linhagens de *Shigella* spp. em cinco *sequence types* STs provenientes de dois complexos clonais diferentes. Existem ao todo no banco de dados de *E.coli/Shigella* 9.196 linhagens, a maior parte da Europa, com 5.865 linhagens e Ásia, com 1.269 linhagens. Com relação aos STs, observa-se no banco que a grande maioria está presente no complexo clonal ST245, cerca de 7.293 linhagens. Assim como as linhagens estudadas no presente trabalho.

Portanto, esses resultados sugerem que linhagens de *S. flexneri* isoladas em diferentes Estados do Brasil, por mais de três décadas descendem um precursor comum (Figura 9). Similarmente, linhagens de *Shigella* spp. isoladas na Europa e Ásia também descendem desse mesmo precursor que está distribuído em diferentes continentes. No país, até o momento não há dados publicados de linhagens de *S. flexneri* tipadas pelo método de MLST e depositadas no Banco de Dados da Universidade de Warwick de *Escherichia coli*.

Os resultados como um todo contribuíram para uma melhor caracterização fenotípica e molecular das *S. flexneri* estudadas, isoladas durante 34 anos em diferentes Estados do Brasil, quanto ao seu potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade genotípica.

7. CONCLUSÕES

- O potencial patogênico das linhagens de *S. flexneri* estudadas foi destacado pela presença de importantes genes de virulência;
- A grande porcentagem de invasão e sobrevivência em células epiteliais Caco-2 e em macrófagos U-937 reforçam o potencial patogênico das linhagens de *S. flexneri* analisadas;
- A alta mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *S. flexneri* reforçam o potencial patogênico das linhagens testadas;
- A alta porcentagem de linhagens de *S. flexneri* MDR encontrada é alarmante, pois pode levar a ineficácia terapêutica quando o tratamento antimicrobiano é necessário;
- Os resultados do ERIC-PCR, PFGE e MLST sugerem que a maioria das linhagens analisadas descendem de um subtipo prevalente de *S. flexneri* que têm circulado por décadas em diferentes Estados do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. F., KLENA, T., HUSAIN, J., MONESTERSKY, J., NAGUIB, A., WASFY, M.O. Genetic characterization of antimicrobial resistance of *Shigella flexneri* 1c isolates from patients in Egypt and Pakistan. **Microbiol Antimicrob**, p. 12–18, 2013.

AHMED, S. F., RIDDLE, M. S., WIERZBA, T. F., MESSIH, I. A., MONTEVILLE, M. R. Epidemiology and genetic characterization of *Shigella flexneri* strains isolated from three paediatric populations in Egypt (2000-2004). **Epidemiol Infect**, n. 134, p. 1237–1248, 2006.

AL-HASANI, K., HENDERSON, I. R., SAKELLARIS, H., RAJAKUMAR, K., GRANT, T., NATARO, J. P., ROBINS-BROWNE, R., ADLER, B. The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infect Immun**, n. 68, p. 2457–2463, 2000.

ANGELINI, M., STEHLING, E. G., MORETTI, M. L., DA SILVEIRA, W. D. Molecular epidemiology of *Shigella* spp. strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Braz J Microbiol**, n. 40, p. 685–692, 2009.

ANGULO, F. J., & SWERDLOW, D. L. Bacterial enteric infections in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clinical infectious diseases**, n. 21(Supplement 1), p. S84-S93, 1995.

ASHKENAZIS & COHEN D. An update on vaccines against *Shigella*. **Therapeutic Advances in Vaccines**, p. 113-123, 2013.

AZMI, I. J., KHAJANCHI, B. K., AKTER, F., HASAN, T. N., SHAHNAIJ, M. Fluoroquinolone resistance mechanisms of *Shigella flexneri* isolated in Bangladesh. **PloS one**, n. 9, p. 102533–102533, 2014.

BHATTACHARYA, D., BHATTACHARYA, H., SAYI, D. S., BHARADWAJ, A. P., SINGHANIA, M., SUGUNAN, A. P., & ROY, S. Changing patterns and widening of antibiotic resistance in *Shigella* spp. over a decade (2000–2011), **Andaman Islands, India. Epidemiology & Infection**, n. 143, v. 3, p. 470-477, 2015.

BANDO, S. Y. et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 786-791, 2010.

BATCHELOR, B. I. F., KIMARI, J. N., & BRINDLE, R. J. Microbiology of HIV associated bacteraemia and diarrhoea in adults from Nairobi, Kenya. **Epidemiology & Infection**, n. 117, v. 1, p. 139-144, 1996.

BARDHAN, P., FARUQUE, A. S., NAHEED, A., & SACK, D. A. Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. **Emerging infectious diseases**, n. 16, v. 11, p. 1718–1723, 2010.

BARNOY, S., GANCZ, H., ZHU, Y., HONNOLD, C. L., ZURAWSKI, D. V., & VENKATESAN, M. M. The *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for evaluation of *Shigella* virulence. **Gut Microbes**, n. 8, v. 4, p. 335-350, 2017.

- BASTOS, F. C., & LOUREIRO, E. C. B. Characterization of antimicrobial resistance of samples of *Shigella* spp. isolated in Belém, Pará State, Brazil (1990-2000)/Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp. isoladas em Belém, Estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Rev Pan-Amaz Saúde**, p. 71-74, 2010.
- BASTOS, F. C. & LOUREIRO, E. C. Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Para, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 44, p. 607–610, 2011.
- BENNISH, M. L. Potentially Lethal Complications of Shigellosis, **Reviews of Infectious Diseases**, n. 13, p. 319–324, 1991.
- BOISEN, N., RUIZ-PEREZ, F., SCHEUTZ, F., KROGFELT, K. A. & NATARO, J. P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli* **Am J Trop Med Hyg**, n. 80, p. 294–301, 2009.
- BOISEN, N., SCHEUTZ, F., RASKO, D. A., REDMAN, J. C., PERSSON S. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J Infect Dis**, n. 205, p. 431–444, 2012.
- BOYD, J. S. K. Some Investigations into So-Called “Non-Agglutinable” *Dysentery Bacilli* **BMJ Military Health**, n. 57, p. 161-186, 1931.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, **Brasília: Ministério da Saúde**, ed. 8, p. 444, 2010.
- BROWN, J. D., WILLCOX, S. J., FRANKLIN, N., HAZELTON, B., HOWARD, P., REINTEN, T., ... & O’SULLIVAN, M. *Shigella* species epidemiology and antimicrobial susceptibility: the implications of emerging azithromycin resistance for guiding treatment, guidelines and breakpoints. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 72, v. 11, p. 3181-3186, 2017.
- BUKHOLM, G.; MODALSLI, K.; DEGRÉ, M. Effect of measles-virus infection and interferon treatment on invasiveness of *Shigella flexneri* in HEp2-cell cultures. **Journal of medical microbiology**, v. 22, n. 4, p. 335-341, 1986.
- CAMPIONI, F. & FALCAO, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **APMIS**, n. 122, p. 215–222, 2014.
- CAMPOS, L. C., FERREIRA, E. O. & SILVA, D. C. V. *Shigella*. **Microbiologia Atheneu, São Paulo**. Edited by Trabulsi, L. R. & Alterthum, F., p. 321–327, 2008.
- CAO, Y., & WEI, D. Multi-locus sequence typing (MLST) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (REP-PCR), characterization of *Shigella* spp. over two decades in Tianjin China. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, n. 3, v. 4, p. 321, 2012.
- CARRARI, M. H. C; TAHAN, S.; MORAIS, M. B. Antibiotic therapy in acute diarrhea associated with *Shigella*: what is the best option? **Jornal de pediatria**, v. 88, p. 366-367, 2012.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION **Antibiotic Resistance Threats in the United States**. Stockholm: CDC. [http:// www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf](http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf), 2013.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **General Information *Shigella* Stockholm: CDC**. <http://www.cdc.gov/shigella/general-information.html>, 2015.

CHATTAWAY, M. A. et al. Identification of *Escherichia coli* and *Shigella* species from whole-genome sequences. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 616-623, 2017.

CHOI, S. Y. et al. Multilocus sequence typing analysis of *Shigella flexneri* isolates collected in Asian countries. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. Pt 11, p. 1460, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for 453 Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria. Approved Standard. 454 **CLSI Document M100-S24**. Wayne: Pennsylvania: CLSI, 2014.

COHEN, D., BASSAL, R., GOREN, S., ROUACH, T., TARAN, D., SCHEMBERG, B., PELED, N., KENESS, Y., KEN-DROR, S., VASILEV, V., NISSAN, I., AGMON, V., SHOHAT, T. Recent trends in the epidemiology of shigellosis in Israel. **Epidemiol Infect**, n. 142, p. 2583–2594, 2014.

CONNOR, T. R. et al. Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in *Shigella flexneri*. **Elife**, v. 4, p. e07335, 2015.

CRUZ, C. B. N., SOUZA, M. C. S., SERRA, P. T., SANTOS, I., BALIEIRO, A., PIERI, F. A., NOGUEIRA, P. A., ORLANDI, P. P. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, p. 1–9, 2014.

DALLMAN, T. J., CHARLES, H., PROCHAZKA, M., SINKA, K., HUGHES, G., GODBOLE, G., & JENKINS, C. Emergence of novel strains of *Shigella flexneri* associated with sexual transmission in adult men in England, 2019–2020. **Journal of medical microbiology**, n. 70, v. 10, 2021.

DAVISON, W. C. A bacteriological and clinical consideration of bacillary dysentery in adults and children, **Medicine**, v. 1, p. 389-510, 1922.

DE COUPADE, C.; SOLITO, E.; LEVINE, J. D. Dexamethasone enhances interaction of endogenous Annexin 1 with L-selectin and triggers shedding of L-selectin in the monocytic cell line U-937. **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 133-145, 2003.

DE PAULA, C. M., MERCEDES, P. G., DO AMARAL, P. H., TONDO, E. C., PAULA, C. M. D., GEIMBA, M. P. Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 41, p. 966–977, 2010.

DETWEILER, C.S.; MONACK D. M.; BRODSKY, I. E.; MATHEW, H.; FALKOW, S. *virK*, *somA* and *rscC* are important for systemic *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection and cationic peptide resistance. **Molecular Microbiology**, v. 48, p.385–400, 2003.

- DINIZ-SANTOS, D. R., SANTANA, J. S., BARRETTO, J. R., ANDRADE, M. G. M., & SILVA, L. R. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian journal of infectious diseases**, v. 9, p. 77-83, 2005.
- D'HERELLE, F. Sur un bacille dysentérique atypique. **Ann Inst Pasteur (Paris)**, n. 30, p. 145, 1916.
- DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**, n. 406, v. 6797, p. 768-774, 2000.
- DUCHAUD, E. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 11, p. 1307-13, 2003.
- DUPONT, H. L., LEVINE, M. M., HORNICK, R. B., FORMAL, S. B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. **J Infect Dis**, n. 159, v. 6, p. 1126-8, 1989.
- DUTTA, S., JAIN, P., NANDY, S., MATSUSHITA, S., YOSHIDA, S. Molecular characterization of serologically atypical provisional serovars of *Shigella* isolates from Kolkata, India. **J Med Microbiol**, n. 63, p. 1696–1703, 2014.
- DRUSIN, L. M., GENVERT, G., TOPF-OLSTEIN B., et al. Shigellosis. Another sexually transmitted disease? **Sexually Transmitted Infections**, n. 52, p. 348-350, 1976.
- EBNET, K.; VESTWEBER, D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. **Histochemistry and cell biology**, v. 112, n. 1, p. 1-23, 1999.
- EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE CENTER. Diseases Related to Water or Transmission Fluid. **São Paulo, Brazil: CVE**, 2009.
- ENITAN, S. S., ODIGIE, J., ADEKUNBI, O. A., EMMANUEL, O. O., OGBONNA, N. I., LAURA, T. M. C., ... & ADETOLA, A. O. Prevalence of shigellosis and associated risk factors among undergraduate students of a private university in Ogun State, Nigeria. **Trends in Infection and Global Health**, v. 1, n. 1), p. 25-36, 2021.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL SURVEILLANCE OF SEVEN PRIORITY FOOD AND WATERBORNE DISEASES IN THE EU. STOCKHOLM: **ECDC**. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-surveillance-report-2015.pdf>, 2015.
- FAHERTY, C., HARPER, J. M., SHEA-DONOHUE, T., BARRY, E. M., KAPER, J. B., FASANO, A., NATARO, J. P. Chromosomal and plasmid-encoded factors of *Shigella flexneri* inducesecretogenic activity ex vivo. **PLoSOne**, n. 7, p. 1–10, 2012.
- FALCAO, J. P., FALCÃO, D. P., PITONDO-SILVA, A., MALASPINA, A. C., BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1539–1548, 2006.

- FAN, W., QIAN, H., SHANG, W., YING, C., ZHANG, X. Low distribution of genes encoding virulence factors in. **Gut Pathog**, v. 9, p. 76, 2017.
- FARFAN, M. J., GARAY, T. A., PRADO, C. A., FILLIOL, I., ULLOA, M. T., TORO, C. S. A new multiplex PCR for differential identification of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* and detection of *Shigella* virulence determinants. **Epidemiol Infect**, v. 138, p. 525–533, 2010.
- FARSHAD, S., RANJBAR, R., HOSSEINI, M. Molecular genotyping of *Shigella sonnei* strains isolated from children with bloody diarrhea using pulsed field gel electrophoresis on the total genome and PCR-RFLP of *ipaH* and *ipaBCD* genes. **J Microbiol**, v. 8, p. 1–7, 2015.
- FARUQUE, S. M., KHAN, R., KAMRUZZAMAN, M., YAMASAKI, S., AHMAD, Q. S., AZIM, T., NAIR, G. B., TAKEDA, Y., SACK, D. A. Isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 3908–3913, 2002.
- FASANO, A., NORIEGA, F. R., MANEVAL, D. R., CHANASONGCRAM, S., RUSSELL, R., GUANDALINI, S., LEVINE, M. M. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **J Clin Invest**, v. 95, p. 2853–2861, 1995.
- FERRECCIO, C., PRADO, V., OJEDA, A., CAYYAZO, M., ABREGO, P., GUERS, LEVINE, M. M. Epidemiologic Patterns of Acute Diarrhea and Endemic Shigella Infections in Children in a Poor Periurban Setting in Santiago, Chile. **American Journal of Epidemiology**, v. 134, n. 6, p. 614–627, 1991.
- FOGH, J.; TREMPPE, G. New human tumor cell lines. In: Human tumor cells in vitro. **Springer, Boston, MA**, p. 115-159, 1975.
- FOXMAN, B., ZHANG, L., KOOPMAN, J. S., MANNING, S. D., & MARRS, C. F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic perspectives & innovations**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2005.
- FRANK, C., WERBER, D., CRAMER, J. P., ASKAR, M., FABER, M., HEIDEN, M., BERNARD, H. FRUTH, A., PRAGER, R., SPODE, A., WADL, M., ZOUFALY, A., JORDAN, S., KEMPER, M. J., FOLLIN, P., MÜLLER, L., KING, L. A., ROSNER, B., BUCHHOLZ, U., STARK, K., KRAUSE, G. Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **N Engl J Med**, v. 365, p. 1771–1780, 2011.
- FRANKEL, G., GIRON, J. A., VALMASSOI, J., SCHOOLNIK, G. K. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. **Mol Microbiol**, v. 3, p. 1729–1734, 1989.
- FREITAS, I. C., MORAES, S. A. Economic profile of Ribeirão Preto population: application of the National Economic Indicator. **Revista de Saude Publica**, v. 44, p. 1150–1154, 2010.
- GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1322-1328, 1999.

- GANAN, M. et al. Effect of growth phase on the adherence to and invasion of Caco-2 epithelial cells by *Campylobacter*. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 1, p. 14-18, 2010.
- GAO, X. et al. Structural insights into *VirB*-DNA complexes reveal mechanism of transcriptional activation of virulence genes. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 22, p. 10529-10541, 2013.
- GHOSH, S., PAZHANI, G. P., NIYOGI, S. K., NATARO, J. P., RAMAMURTHY, T. Genetic characterization of *Shigella* spp. isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. **J Med Microbiol**, v. 63, p. 903–910, 2014.
- GONZALEZ-TORRALBA, A., GARCÍA-ESTEBAN, C. & ALÓS, J. I. Enteropathogens and antibiotics. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, p. 1–8, 2015.
- GONZALES, J. C., SERIBELLI, A. A., GOMES, C. N., DOS PRAZERES RODRIGUES, D., CAMPIONI, F., PASSAGLIA, J., DA SILVA, P., FALCÃO, J. P. A high number of multidrug-resistant and predominant genetically related cluster of *Shigella flexneri* strains isolated over 34 years in Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1563–1571, 2020.
- GUERRANT, R. L., VAN GILDER, T., STEINER, T. S., THIELMAN, N. M., SLUTSKER, L., TAUXE, R. V., HENNESSY, T., GRIFFIN, P. M., DUPONT, H., SACK, R. B., TARR, P., NEILL, M., NACHAMKIN, I., RELLER, L. B., OSTERHOLM, M. T., BENNISH, M. L., PICKERING, L. K. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin Infect Dis**, v. 32, p. 331–351, 2001.
- GU, B., CAO, Y., PAN, S., ZHUANG, L., YU, R., PENG, Z., QIAN, H., WEI, Y., ZHAO, L., LIU, G., TONG, M. Comparison of the prevalence and changing resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin of *Shigella* between Europe–America and Asia–Africa from 1998 to 2009. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 9-17, 2012.
- GUYER, D. M., HENDERSON, I. R., NATARO, J. P., & MOBLEY, H. L. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 1, p. 53-66, 2000.
- HARDY, S. P., KOHLER, W. Investigating bacillary dysentery: the role of laboratory, technique and people. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 4-5, p. 171-178, 2006.
- HENDERSON, I. R., CZECZULIN, J., ESLAVA, C., NORIEGA, F., NATARO, J. P. Characterization of *pic*, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, p. 5587–5596, 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*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 4, p. 32895–32900, 1998.

HOSANGADI, D.; SMITH, P. G.; KASLOW, D. C.; GIERSING, B. K. WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6–7th April 2017: Meeting report. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p. 7381-7390, 2019.

HU, L.; TALL, B. D.; CURTIS, S. K.; KOPECKO, D. J. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5294-5304, 2008.

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

IWAI, H., KIM, M., YOSHIKAWA, Y., ASHIDA, H., OGAWA, M., FUJITA, Y., MULLER, D., KIRIKAE, T., JACKSON, P. K., KOTANI, S., SASAKAWA, C. A bacterial effector targets *Mad2L2*, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. **Cell**, v. 130, p. 611–623, 2007.

IZUMIYA, H., TADA, Y., ITO, K., MORITA-ISHIHARA, T., OHNISHI, M., TERAJIMA, J. & WATANABE, H. Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1486–1491, 2009.

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

KARIMI-YAZDI, M., GHALAVAND, Z., SHABANI, M., HOURI, H., SADREDINAMIN, M., TAHERI, M., & ESLAMI, G. High rates of antimicrobial resistance and virulence gene distribution among *Shigella* spp. isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. **Infection and drug resistance**, v. 13, p. 485, 2020.

KINGOMBE, C. I., CERQUEIRA-CAMPOS, M. L. & FARBER, J. M. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Food Prot**, v. 68, p. 239–245, 2005.

KLIRCK, M. D., PIRES, S. M., BLACK, R. E., CAIPO, M., CRUMP, J. A., DEVLEESSCHAUWER, B., DÖPFER, D., FAZIL, A., FISCHER-WALKER, C. L., HALD, T., HALL, A. J., KEDDY, K. H., LAKE, R. J., LANATA, C. F., TORGERSON, P. R., HAVELAAR, A. H., ÂNGULO, F. J. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS Med**, v. 12, 2015.

KLONTZ, K. C., & SINGH, N. Treatment of drug resistant *Shigella* infections. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 1, p. 69-80, 2015.

KOOLMAN, L.; WHYTE, P.; BURGUESS, C.; BOLTON, D. Virulence gene expression, adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* exposed to oxidative stress (H₂O₂). **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 33-38, 2016.

KOPPOLU, V., OSAKA, I., SKREDENSKE, J. M., KETTLE, B., HEFTY, P. S., LI, J., EGAN, S. M. Small-molecule inhibitor of the *Shigella flexneri* master virulence regulator *virF*. **Infect Immun**, v. 81, p. 4220–4231, 2013.

KOREN, H. S.; ANDERSON, S. J.; LARRICK, J. W. *In vitro* activation of a human macrophage-like cell line. **Nature**, v. 279, n. 5711, p. 328-331, 1979.

KOTLOFF, K. L.. Shigella infection in children and adults: a formidable foe. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 12, p. 1166-1167, 2017.

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

KOSEK, M., YORI, P. P., GILMAN, R. H., VELA, H., OLORTEGUI, M. P., CHAVEZ, C. B., CALDERON, M., BAO, J. P., HALL, E. & OTHER AUTHORS. Facilitated molecular typing of *Shigella* isolates using ERIC-PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, p. 1018–1025, 2012.

KRISTJÁNSSON, M., VINER, B., & MASLOW, J. N. Polymicrobial and recurrent bacteremia with *Shigella* in a patient with AIDS. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 26, n. 4, p. 411-416, 1994.

KRUSE, W. Ueber die Ruhr als Volkskrankheit und ihren Erreger1. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 26, n. 40, p. 637-639, 1900.

KRUSE W. Weitere Untersuchungen über die Ruhr. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 27, p. 370–372, 1901.

LAMPEL, K. A., FORMAL, S. B., MAURELLI, A. T. A Brief History of *Shigella*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

LIMA, A. A., LIMA, N. L., PINHO, M. C., BARROS JUNIOR, E. A., TEIXEIRA, M. J., MARTINS, M. C., GUERRANT, R. L. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 256-259, 1995.

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

LIMA, C. B. C., SANTOS, S. A. D., ANDRADE, D. R. D. Hypoxic stress, hepatocytes and CACO-2 viability and susceptibility to *Shigella flexneri* invasion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 341-346, 2013.

LIMA, I. F. N., HAVT, A., LIMA, A. A. M. (2015). Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, p. 30–37, 2015.

LAWLOR, K. M., PAYNE, S. M. AEROBACTIN genes in *Shigella* spp. **J Bacterial**, v. 160, p. 266–272, 1984.

LEE, T. M., CHANG, C. Y., CHANG, L. L., CHEN, W. M., WANG, T. K., CHANG, S. F. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, p. 173–181, 2003.

LIU, Y., CHENG, Y., YANG, H., HU, L., CHENG, J. Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Shigella flexneri* Isolates with Fosfomycin Resistance From Patients in China. **Ann Lab Med**, v. 37, p. 415–419, 2017.

LLUQUE, A., MOSQUITO, S., GOMES, C., RIVEROS, M., DURAND, D. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). **Int J Med Microbiol**, v. 305, p. 480–490, 2015.

MACCANNELL, D. Bacterial strain typing. **Clinics in laboratory medicine**, v. 33, n. 3, p. 629-650, 2013.

MARDANEH, J., ABBAS POOR, S., & AFRUGH, P. Prevalence of *Shigella* species and antimicrobial resistance patterns of isolated strains from infected pediatrics in Tehran. **Int J Enteric Pathog**, v. 1, n. 1, p. 28-31, 2013.

MEDEIROS, M. I., NEME, S. N., DA SILVA, P., CAPUANO, D. M., ERRERA, M. C., FERNANDES, S. A., DO VALLE, G. R. & DE AVILA, F. A., SILVA, P. & AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, p. 21–24, 2001.

MEDEIROS, P. H. Q. S, LIMA, A. M., GUEDES, M. M., HAVT, A., BONA, M. D. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 90, p. 198–205, 2018.

MESQUITA, A. M. R. C., LIMA, N. L., & LIMA, A. Â. M. Avaliação da susceptibilidade e resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de pacientes com diarréia nosocomial. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 3, p. 292-300, 2009.

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

MOHAN, K., HIBBERT, M., ROONEY, G., CANVIN, M., CHILDS, T., JENKINS, C., ... & FIELD, N. What is the overlap between HIV and shigellosis epidemics in England: further evidence of MSM transmission? **Sexually transmitted infections**, v. 94, n. 1, p. 67-71, 2018.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. *QseC* mediates *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* virulence *in vitro* and *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 914-926, 2010.

MORENO, A. C. R.; GONÇALVES FERREIRA, L.; BAQUERIZO MARTINEZ, M. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. **FEMS microbiology letters**, v. 301, n. 2, p. 156-163, 2009.

MOUNIER, J. et al. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. **Infection and immunity**, v. 60, n. 1, p. 237-248, 1992.

- NATARO, J. P., BOPP, C. A., FIELDS, P. I., KAPER, J. B., STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In **Manual of Clinical Microbiology**, p. 603–626, 2011.
- NISA, I., QASIM, M., YASIN, N. et al. *Shigella flexneri*: an emerging pathogen. **Folia Microbiol**, v. 65, p. 275–291, 2020.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. **J Microbiol**, v. 43, p. 133–143, 2005.
- NOGUEIRA CASTRO, B., NOGUEIRA CASTRO, A. F., BARBOSA MEDEIROS, R., & DA SILVA LIMA, L. Síndrome Hemolítico-Urêmica Típica em adulto. **Revista De Saúde**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 2021.
- NONAKA, T. et al. *Shigella flexneri* YSH6000 induces two types of cell death, apoptosis and oncosis, in the differentiated human monoblastic cell line U937. **FEMS microbiology letters**, v. 174, n. 1, p. 89-95, 1999.
- NORIEGA, F. R., LIAO, F. M., FORMAL, S. B., FASANO, A., LEVINE, M. M. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. **J Infect Dis**, v. 172, p. 1408–1410, 1995.
- NUNES, M. R., MAGALHAES, P. P., PENNA, F. J., NUNES, J. M., MENDES, E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **J Pediatr**, v. 88, p. 125–128, 2012.
- OGAWA, M., HANDA, Y., ASHIDA, H., SUZUKI, M., & SASAKAWA, C. The versatility of *Shigella* effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2008.
- OLIVE, D. M., & BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- OLIVEIRA, M. M., DE ALMEIDA, F. A., BAGLINIÈRE, F., DE OLIVEIRA, L. L., VANETTI, M. C. D. Behavior of *Salmonella Enteritidis* and *Shigella flexneri* during induction and recovery of the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 14, 2021.
- ORLANDI, P. P., SILVA, T., MAGALHAES, G. F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R. P., DURLACHER, R., DA SILVA, L. H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondonia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 621–625, 2001.
- PASQUA, M. et al. The MFS efflux pump *EmrKY* contributes to the survival of *Shigella* within macrophages. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- PEIRANO, G., SOUZA, F. S., RODRIGUES, D. P. & SHIGELLA STUDY GROUP. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 245–250, 2006.

PENATTI, M. P. A., HOLLANDA, L. M., NAKAZATO, G., CAMPOS, T. A., LANCELLOTTI, M., ANGELLINI, M., BROCCHI, M., ROCHA, M. M. M., SILVEIRA, W. D. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. **Braz J Med Res**, v. 40, p. 249–258, 2007.

PIKE, M. C. et al. Development of specific receptors for N-formylated chemotactic peptides in a human monocyte cell line stimulated with lymphokines. **The Journal of experimental medicine**, v. 152, n. 1, p. 31-40, 1980.

POIREL L., CATTOIR V., NORDMANN P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Front Microbiol**, v. 3, p. 24, 2012.

POLI, V. F.; THORSEN, L.; OLESEN, I.; WIK, M. T.; JESPERSEN, L. Differentiation of the virulence potential of *Campylobacter jejuni* strains by use of gene transcription analysis and a Caco-2 assay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 1-2, p. 60-68, 2012.

QIN, T., GU, B. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance among Different Serotypes of *Shigella flexneri* Isolated from Jiangsu Province of China During 2001-2011. **J Infect Dis**, v. 71, p. 256–257, 2018.

QU, M., ZHANG X., LIU, G., HUANG, Y., JIA, L., LIANG, W., LI, X., WU, X., LI, J., YAN, H., KAN, B., WANG, Q. An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, p. 904–908, 2014.

RANJBAR, R., MOHAMMAD, J. H., KAFFASHIAN, A. R., SHOHREH, F. AN outbreak of shigellosis due to *Shigella flexneri* serotype 3a in a prison in Iran. **Archives of Iranian medicine**, v. 13, p. 413–6, 2010.

RANJBAR, R., AFSHAR, D., TAVANA, A. M., NAJAFI, A., POURALI, F., SAFIRI, Z., ... & JAFARI, N. J. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of three pathogenic *Shigella* species. **Iranian journal of public health**, v. 43, n. 12, p. 1657, 2014.

RIBOT, E. M., FITZGERALD, C., KUBOTA, K., SWAMINATHAN, B., & BARRETT, T. J. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1889-1894, 2001.

RIBOT, E. M., FAIR, M. A., GAUTOM, R., CAMERON, D. N., HUNTER, S. B., SWAMINATHAN, B. & BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, p. 59–67, 2006.

RIVAS, M., MILIWEBSKY, E., CHINEN, I., DEZA, N., LEOTTA, G. A. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. **Medicina**, v. 66, p. 27-32, 2006.

ROWE-MAGNUS, D. A., GURROUT A. M., MAZEL, D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. **Mol Microbiol**, v. 43, p. 1657–1669, 2002.

RUEKIT, S., WANGCHUK, S., DORJI, T., TSHERING, K. P., POOTONG, P., NOBTHAI, P., SERICHANTALERGS, O., PORAMATHIKUL, K., BODHIDATTA, L. Molecular characterization and PCR-based replicon typing of multidrug resistant *Shigella sonnei* isolates from an outbreak in Thimphu, Bhutan. **BMC Res Notes**, v. 7, p. 1–9, 2014.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, W. D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3, **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001.

SANSONETTI, P. J., ARONDEL, J., CANTEY, J. R., PRÉVOST, M. C., & HUERRE, M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2752-2764, 1996.

SANSONETTI, P. J. The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. **Ann N Y Acad**, v. 1072, p. 307–312, 2006.

SANTOS, C. S.; SANTOS, L. S.; SOUZA, M. C.; DOURADO, F. S.; DIAS, A. A. S. O.; SABBADINI, P. S.; PEREIRA, G. A.; CABRAL, M. C.; JUNIOR, R. H.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p.1-10, 2010.

SCHUCH, R. & MAURELLI, A. T. Virulence plasmid instability in *Shigella flexneri* 2a is induced by virulence gene expression. **Infect Immun**, v. 65, p. 3686–3692, 1997.

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

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A. P. & GAASTRA, W. EDITORIAL: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 601–604, 2010.

SERIBELLI, A. A., FRAZÃO, M. R., MEDEIROS, M. I. C., FALCÃO, J. P. Molecular and phenotypic characterization of strains of *Shigella sonnei* isolated over 31 years suggests the circulation of two prevalent subtypes in São Paulo State, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 65, p. 666–677, 2016.

SHAHNAIJ, M., LATIF, H. A., AZMI, I. J., AMIN, M. B., LUNA, S. J. Characterization of a serologically atypical *Shigella flexneri* Z isolated from diarrheal patients in Bangladesh and a proposed serological scheme for *Shigella flexneri*. **PLoS One**, v. 13, p. 202–704, 2018.

SHAHSAVAN, S. et al. Tetracycline and Azithromycin Resistance Investigation on *Shigella* spp. Isolated from the Stool of Children with Diarrhea in Tehran, Iran. **Journal of Ardabil University of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 282-291, 2016.

SHARMA, A., SINGH, S. K., BAJPAI, D. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. with reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. **Indian J Microbiol**, v. 49, p. 259–265, 2009.

SHIGA, K. The Trend of Prevention, Therapy and Epidemiology of Dysentery since the Discovery of Its Causative Organism. **New England Journal of Medicine**, v. 215, n. 26, p. 1205-1211, 1936.

SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B., PAIXÃO, GERMANA C., LIMA, S. B., M., FILHO, R. E., ROCHA, M. F. G., LIMA, A. Â. M. Multiple antibiotic-resistance mediated by R plasmid in *Shigella flexneri* strains isolated in the Northeast of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 263–270, 1998.

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

SILVA, T., NOGUEIRA, P. A., MAGALHAES, G. F., GRAVA, A. F., SILVA, L. H. & ORLANDI, P. P. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 731–733, 2008.

SONNE, C. Über die Homogenität der Lungenluftmischungen. **Pflüger's Arch**, p. 163, v. 75–96, 1915.

SLOPEK, S.; MULCZYK, M. Concerning the classification of *Shigella flexneri* 6 bacilli. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 15, n. 4, p. 600-603, 1967.

SOUSA, M. Â., MENDES, E. N., COLLARES, G. B., PERET-FILHO, L. A., PENNA, F. J., MAGALHAES, P. P. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30–35, 2013.

SUPERINTENDENT OF ZONOSIS CONTROL, SURVEILLANCE AND SANITARY INSPECTION (SCZ) Newsletter Disclosure Technical and Scientific. **Municipal Health**, v. 2, p. 1–11, 2000.

SURDEANU, M., CIUDIN, L., PENCU, E., & STRAUT, M. Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. **European journal of epidemiology**, v. 18, n. 7, p. 703-710, 2003.

SUNDSTRÖM, C.; NILSSON, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **International Journal of Cancer**, v. 17, n. 5, p. 565-577, 1976

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 Organ**, v. 77, p. 651–666, 1999.

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

TANG, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. **Fly**, v. 3, n. 1, p. 105-111, 2009.

- TANEJA, N., & MEWARA, A. Shigellosis: Epidemiology in India. **The Indian journal of medical research**, v. 143, n. 5, p. 565–576, 2016.
- THE, H. C., RABAA, M. A., THANH, D. P., RUEKIT, S., WANGCHUK, S., DORJI, T., TSHERING, K. P. & BAKER, S. Introduction and establishment of fluoroquinolone-resistant *Shigella sonnei* into Bhutan. **Microbial Genomics**, p. 1–11, 2015.
- THE, H. C., THANH, D. P., HOLT, K. E., THOMSON, N. R. & BAKER, S. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature**, p. 1–16, 2016.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., & GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.
- THJØTTA T. On the Bacteriology of Dysentery in Norway. **J Bacteriol**, v. 4, n. 4, p. 355-378, 1919.
- THONG, K. L., HOE, S. L., PUTHUCHEARY, S. D., YASIN, R. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 1–7, 2005.
- TIEMENS, K. M., SHIPLEY, P. L., CORREIA, R. A., SHIELDS, D. S., GUERRANT, R. L. Sulfamethoxazole-trimethoprim-resistant *Shigella flexneri* in northeastern Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 25, p. 653–654, 1984.
- TORRES, A. G. Current aspects of *Shigella* pathogenesis. **Revista Latino americana de Microbiologia**, v. 46, v. 3, p. 89-97, 2004.
- TROFA, A. F., UENO-OLSEN, H., OIWA, R., YOSHIKAWA, M. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus, **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1303–1306, 1999.
- TSAI, C., JIA-YUN; L., JACELYN M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.
- UD-DIN, A. I. M. S., WAHID, S. U. H., LATIF, H. A., SHAHNAIJ, M., AKTER, M., AZMI, I. J., HASAN, T. N., AHMED, D., HOSSAIN, M. A, TALUKDER, K. A. & OTHER AUTHORS Changing trends in the prevalence of *Shigella* species: emergence of multi-drug resistant *Shigella sonnei* biotype g in Bangladesh. **PLoS One**, v. 8, p. 1–7, 2013.
- UCHIYA, K., T. TOBE, K. KOMATSU, T. SUZUKI, M. WATARAI, I. FUKUDA, M. YOSHIKAWA, C. SASAKAWA. Identification of a novel virulence gene *virA* on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading. **Mol. Microbiol**, v. 17, p. 241–250, 1995.
- URWIN, R.; MAIDEN, M. C.. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 479-87, 2003.

- VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.
- VARGAS, M., GASCON, J., ANTA, M. T. J., VILA, J. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 3608–3611, 1999.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, p. 6823–6831, 1991.
- VIDAL, M., KRUGER, E., DURAN, C., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V., TORO, C. & VIDAL, R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 5362–5365, 2005.
- VINH, H., NHU, N. T., NGA, T. V., DUUY, P. T., CAMPBELL, J. I., HOANG, N. V., BONI, M. F., MY, P. V., PARRY, C, BAKER, S. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 1–12, 2009.
- VOKES, S. A., REEVES, S. A., TORRES, A. G. & PAYNE, S. M. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. **Mol Microbiol**, v. 33, p. 63–73, 1999.
- VON SEIDLEIN, L., KIM, D. R., ALI, M., LEE, H., WANG, X., THIEM, V. D., et al. A Multicentre Study of *Shigella* Diarrhoea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology. **PloS Med**, v. 3, n. 9, 2006.
- VUBIL, D., BALLESTE-DELPPIERRE, C., MABUNDA, R., ACÁCIO, S., GARRINE. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Shigella* isolates recovered from children aged less than 5 years in Manhica, Southern Mozambique. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, p. 881–887, 2018.
- WILMER, A. et al. *Shigella flexneri* serotype 1 infections in men who have sex with men in Vancouver, Canada. **HIV medicine**, v. 16, n. 3, p. 168-175, 2015.
- WILSON, L. A., & SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-1168, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1**, p. 1–70, 2005.
- WU, H. H., SHEN, Y. T., CHIOU, C. S., FANG, C. T., & LO, Y. C. Shigellosis outbreak among MSM living with HIV: a case-control study in Taiwan, 2015–2016. **Sexually transmitted infections**, v. 95, n. 1, p. 67-70, 2019.
- WYSOK, B.;WOJTACKA, J. Detection of virulence genes determining the ability to adhere

- and invade in *Campylobacter* spp. from cattle and swine in Poland. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p-257-263, 2018.
- YE, C. et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 419-426, 2010.
- YAGHOUBI, S., RANJBAR, R., DALLAL, M. M. S., FARD, S. Y., SHIRAZI, M. H. Profiling of Virulence-associated Factors in Osong. **Public Health Res Perspect**, v. 8, p. 220–226, 2017.
- YANG, C., LI, P., ZHANG, X., MA, Q., CUI, X., LI, H., ... & SONG, H. Molecular characterization and analysis of high-level multidrug-resistance of *Shigella flexneri* serotype 4s strains from China. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ZAIDI, M. B., ESTRADA-GARCÍA, T., CAMPOS, F. D., CHIM, R., ARJONA, F., LEON, M., MICHELL, M., CHAUSSABEL, D. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 288, 2013.
- ZAMANLOU, S., REZAEI, M. A., AGHAZADEH, M., GHOTASLOU, R., NAVE, H.H. Genotypic Diversity of Multidrug Resistant *Shigella* species from Iran. **Infect Chemother**, v. 50, p. 29–37, 2018.
- ZHANG, J., JIN, H., HU, J., YUAN, Z., SHI, W., YANG, X., XU, X. & MENG, J. Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. from humans in Shanghai, China, 2004-2011. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 78, p. 282–286, 2014.
- ZUMLA, A. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 5, p. 303-304, 2010.
- ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M. C., SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, v. 358, p. 167–169, 1992.

Linhagem	Ano	Estado	Perfil de virulência	Perfil antimicrobiano	ERIC-PCR	PFGE	MLST
5187	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/sen/virF/pic/virB/igpD/virA	–	A	A1	
5188	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sepA/sat/sen/virF/pic/igpD	SXT/TE/C	A	A1	
5189 * £	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/set1B/set1A/sepA/sat/sen/virF/pic/virA	–	A	A1	ST245
5190	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/sepA/sat/pic/virA	SXT/TE	A	A1	
5191	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/set1A/sepA/sat/sen/virF/pic/virA	AMP/SAM/PRL	A	A1	
5192	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/sepA/sat/sen/virF/pic/icsA/virB	AMP/SXT/TE	A	A1	
5193	1983	SP	ipaH/iuc/sat/pic/virA	AMP/AMC/SAM/PRL	A	A1	
5194	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/set1A/sat/virF/pic/virA	AMP/SXT/C	A	A1	
5195	1983	SP	ipaH/sigA/ipaBCD/set1A/sepA/sat/sen/virF/icsA/virA	AMP/SAM/SXT/C	A	A1	
5196	1983	SP	ipaH/iuc/sigA/set1A/sat/sen/virF	TE/C	A	A1	
5197	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/set1A/sat/virA	AMP/AMC/SAM/TE/PRL/C	A1	A1	
5198	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/sat/sen/virA	CTX	A1	A1	
5199	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/sat/virB	AMP/AMC/SXT/TE/PRL/C	B	A1	
5200 * £	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/ipaBCD/sat/sen/virF	AMP/AMC/SAM/SXT/TE/PRL	A1	A1	ST245
5201	1984	SP	ipaH/iuc/sat/sen/virF/virA	TE/C	A1	A1	
5202	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/set1B/sat/sen/virF/virB/virA	SXT/C	A1	B	
5203	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/sat/virB/igpD/virA	–	A1	A1	
5204	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/sen/virF/icsA/virB	SXT/TE	A1	A	
5205	1984	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1A/sepA/sen/virF/virB/virA	C	A1	A1	
5206	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF/icsA/virA	–	A1	A1	
5207	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF/virA	–	B	A1	
5208	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF/virA	SXT	A1	A1	
5209	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sen/virF/virA	CN	A1	A1	
5210 *	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/sen/virF/virA	AMP/AMC/SAM	A1	A1	ST245
5211	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF/icsA/virB/virA	AMP/SXT/PRL/C	A1	A1	

Continua

Continuação

5212	1985	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/set1A/sepA/sen/virF/icsA/virB/ipagD/virA	AMP/CAZ	A1	A1	
5213	1986	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sepA/virA	SXT/TE/C	A1	B	
5214	1986	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sen/virA	SXT/TE	A1	B	
5215	1986	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sen/virF/icsA/virA	–	A1	B	
5217 *	1986	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/virF/virA	SXT/TE/C	A1	B	ST245
5218 *	1987	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sat/virA	AMP/SXT/TE	A1	A1	ST245
5219	1987	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA/sen/virF/virA	SXT/TE	A1	B	
5220	1987	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA/sat/sem	SXT	A1	B	
5221	1987	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/virA	SXT/TE	A1	A1	
5223	1988	SP	ipaH/iuc/ial/sepA/sat/virF	SXT/TE	A1	A1	
5224	1988	SP	ipaH/iuc/ial/ipaBCD/set1B/ipgD	SXT/TE	A1	B	
5225 *	1988	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA/virF/virA	AMP/SAM/SXT/TE	B	A1	ST245
5226	1988	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virB/virA	SXT	B	A1	
5227	1988	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sat/sen/virF/virA	AMP/SAM/SXT/TE/C	A1	A1	
5228	1989	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sen/virF/virA	AMP/SXT/TE	A1	A1	
5229	1989	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sen/virF/virA	AMP/SXT/TE	A1	A1	
5230 *	1989	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF	AMP/SAM/SXT/TE/C	A1	A1	ST245
5231	1989	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sen/virF	SXT/TE/C	A1	A1	
5232 £	1990	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/virF/virA	AMP/SAM/SXT/TE/PRL/C	A1	A1	ST245
5233 *	1990	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sen/virA	SXT	A1	A1	ST245
5236 *	1991	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/sepA/sat/virA	SXT/TE	A1	A1	ST245
5237	1991	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA/sat/virF/virA	AMP/TE	A1	A1	
5238	1992	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA/sat/virF/virA	AMP/SAM/TE	A1	A1	
5239 *	1992	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sat/sen/virF/virA	SXT	A1	A1	ST245
5240	1992	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/sen/virA	AMP/IMP/TE/C	A1	A1	
5241	1993	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sat/sen/virA	C	A1	A1	
5242	1993	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sat/sen/virF/virA	SXT/C	A1	A1	
5243 *	1993	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sat/sen/virF/virA	–	B	A1	ST245
5244	1994	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/sen/virF/virB/virA	SXT/TE/CTX	A1	A1	

Continua

Continuação

5245	1994	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sen/virB/virA	–	A1	A1	
5246	1994	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBDC/set1B/set1A/sen/virF/virB/virA	SXT	A1	A1	
5247 *	1994	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sat/virA	SAM/TE/PRL/C	A1	A1	ST245
5248 £	1995	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/sat/virA	–	A1	A1	ST245
5249 *	1995	SP	ipaH/iuc/ial/set1B/set1A/sat/icsA/virA	AMP/AMC/SAM/TE/PRL	A1	A1	ST245
5250	1995	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/sen/virA	AMP/SAM/TE/PRL/C	A1	A1	
5251	1996	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sen/virA	SXT/TE/C	A1	A1	
5252	1996	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/virA	SXT	A1	A1	
5253 *	1996	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/virA	–	A1	A1	ST245
5254	1996	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sen/icsA	AMP	A1	A1	
5255	1996	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/icsA	SXT/TE	A1	A1	
5256	1997	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/icsA	AMP/SAM/PRL	A1	A1	
5257 *	1997	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/icsA	AMP/SXT/PRL	A1	A1	ST245
5258	1997	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sen/icsA	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	
5259	1997	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/sen	SXT/TE	A1	A1	
5260 *	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/virF/icsA/virA	AMP/TE/CAZ/C	A1	A1	ST245
5261	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/virA	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	
5262	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/virF/virA	C	A1	A1	
5263	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sepA/sat/virF/virA	AMP/PRL/C	A1	A1	
5264	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/virF/virA	C	A1	A1	
5265	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/virF	–	A1	A1	
5266	1998	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sepA/sat	–	A1	A1	
5267 *	1999	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/virF	AMP/TE/PRL/C	A1	A1	ST245
5269	2000	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/set1A/sat/virF/virA	AMP/TE/C	A1	A1	
5270 *	2000	SP	ipaH/iuc/set1B/set1A/sepA/sat/virF	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	ST245
5271	2000	SP	ipaH/iuc/ial/ipaBCD/set1B/sepA/sat/virF	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	
5272	2000	SP	ipaH/iuc/ipaBCD/sat/virF/virA	AMP/TE	A1	A1	
5273 *	2001	SP	ipaH/iuc/ial/sepA/sat/virF	AMP/TE/C	A1	A	ST245

Continua

Continuação

5274 *	2002	SP	ipaH/iuc/ial/sen/virF	AMP/TE	A1	A1	ST245
5275 *	2003	SP	ipaH/iuc/ial/ipaBCD/sat/virF/virA	AMP/TE	A1	A1	ST245
5276	2003	SP	ipaH/iuc/ial/virF/virA	AMP/TE/C	A1	A1	ST245
5277 *	2003	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sat/virF/virA	NA/C	A1	A1	ST245
5278 * £	2004	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/virA	C	A1	A1	ST245
5279 *	2005	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/virF/virA	SXT/TE/C	A1	A1	
5280 *	2006	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/virA	AMP/CTX	A1	A	
03/10 *	2010	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/virA	AMP/SXT/TE	A1	A	
51/10 *	2010	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1A/virF/virA	SXT/TE/C	A1	A	
71/10 * £	2010	PA	ipaH/iuc/ial/sat/virA	AMP/SXT/TE	A1	A	ST245
74/10	2010	PA	ipaH/iuc/ial/virA	AMP/SXT/TE/PRL	A1	B	ST245
41/11 *	2011	RS	ipaH/iuc/ial/virA	AMP/SXT/TE	A1	B	ST245
47/11 *	2011	RN	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/virF/virA	SXT/TE	A1	A1	ST245
25/12 *	2012	RJ	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/set1A/virA	SXT/TE	A1	A1	ST245
32/12 *	2012	RS	ipaH/iuc/ial/ipaBCD/set1B/set1A/sat/sen/virA	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	ST245
35/12 *	2012	PE	ipaH/iuc/sigA/ial	AMP/TE	A	A1	ST245
60/12 *	2012	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/set1A/virA	SXT	A	A1	ST245
61/12 *	2012	MA	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/set1A/sat/virF/virA	AMP/TE/C	A	A1	ST245
5282	2013	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/virF/virA	C	A1	A1	
5283	2013	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/virF/virA	SXT	A1	A1	
5284	2013	SP	ipaH/iuc/ial/virF/virA	AMP/CN/SXT/PRL	A1	A1	
5285	2013	SP	ipaH/iuc/ial/set1B/virF/virA	AMP/SXT/TE/PRL/C	A1	A1	

Continua

Continuação

5286	2013	SP	ipaH/iuc/ial/set1B/set1A/ipgD/virA	AMP/TE/PRL/C	A1	A1	
5281	2010	SP	ipaH/iuc/sigA/ial/sat/virF/virA	C	A1	A1	
03/13 *	2013	RN	ipaH/iuc/sigA/ial/ipaBCD/set1B/sat/virA	SXT/TE/C	A	A1	ST245
28/13 *	2013	RJ	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sat/virF/virA	AMP/IMP/TE	A	A1	ST245
29/13 *	2013	RJ	ipaH/iuc/sigA/ial	AMP	A	A1	ST245
44/13 *	2013	PE	ipaH/iuc/ial/set1B/set1A/sat/virF/virA	SXT	A	A1	ST245
61/13 *	2013	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1A/sat/virF/virA	AMP/TE/C	A	A1	ST245
77/13	2013	MG	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/set1A/virF/virA	NA/FEP/CAZ/CTX	A	A1	
80/13	2013	PE	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virF/virA	AMP/C	A1	A1	
82/13	2013	PE	ipaH/iuc/ial/set1B/set1A/sepA/virF/virA	TE	A	A1	
86/13	2013	PE	ipaH/iuc/ial/sepA/virA	TE	A	A1	
95/13	2013	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virA	AMP/C	A	A1	
06/14 *	2014	CE	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virB/virA	AMP/TE/C	A	A1	ST245
07/14	2014	CE	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virA	AMP/TE/C	A	A1	
16/14	2014	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virA	AMP/SXT/TE	A	A1	
19/14	2014	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virA/virB	AMP/SXT/TE	A	A1	
45/14 *	2014	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virF	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	ST245
26/15	2015	AP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA/virB	–	A1	A1	
27/15 * £	2015	AP	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA	–	A1	A1	ST245
32/15	2015	PE	ipaH/iuc/ial/set1B/set1A	AMP/SXT/TE	A1	A1	
37/15 *	2016	RS	ipaH/ial	AMP	B	A1	ST245
40/15 *	2015	MA	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA	AMP/AMC	B	A1	ST245
81/15 *	2015	PE	ipaH/iuc/ial/set1B/sepA	AMP/SXT/TE	A1	A1	ST245
82/15 *	2015						ST245
18/17 * £	2017	BA	ipaH/iuc/ial/set1A/sepA	AMP/SXT/TE	B	A	ST245
19/17 *	2017	RS	ipaH/iuc/sigA/ial/set1B/sepA	AMP/SXT/TE/C	A1	A1	ST245
23/17 *	2017	SE	ipaH/iuc/sigA/ial/sepA	AMP/SXT	A1	A	ST245

As linhagens destacadas com (*) foram estudadas nos ensaios de invasão e sobrevivência em células epiteliais Caco-2, macrófagos U-937 e MLST. As linhagens destacadas com (£) foram estudadas nos ensaios com *Galleria mellonella*. **Abreviações dos Estados:** AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais, PA: Pará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SE:

Continuação

Sergipe; SP: São Paulo. **Abreviações dos antimicrobianos:** IMP: Imipenem; FEP: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina; OFLX: Ofloxacina; NA: Ácido nalidíxico; PIP: Piperacilina; AMP: Ampicilina; AMC: Ácido clavulânico-amoxicilina; SAM: Sulbactam-ampicilina; CN: Gentamicina; TE: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprima; C: Cloranfenicol.

