

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Mário Paulo Amante Penatti

“CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E
MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Shigella flexneri*
E *Shigella sonnei* ISOLADAS DA REGIÃO DE
CAMPINAS – SP”

Este exemplar corresponde à redação
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Mário Paulo Amante Penatti
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Penatti, Mário Paulo Amante

P371e

Caracterização Biológica e Molecular de amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* isoladas da região de Campinas – SP/
Mário Paulo Amante Penatti. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Shigella* spp. 2. Drogas - Resistência em microrganismos
3. Patogenicidade. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Silveira,
Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil.

Palavras-chave em inglês: *Shigella*; Drug – resistance in microorganisms; Patogenicity; Polymerase chain reaction.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Wanderley Dias da Silveira, Antonio Fernando Pestana de Castro, Marcelo Palma Sircili, Fabiana Fantinatti Garboggini, Marcelo Brocchi.

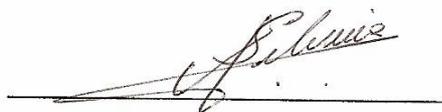
Data da defesa: 27/08/2007.

Programa de Pós graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de Agosto de 2007.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
(Titular)



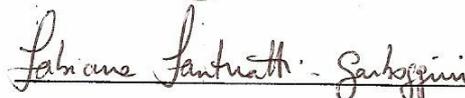
Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro
(Titular)



Prof. Dr. Marcelo Brocchi
(Titular)



Profa Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini
(Titular)



Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili
(Titular)



Profa Dra. Geize Villela
(Suplente)



Profa Dra. Cleide Ferreira Catani
(Suplente)



Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização, nos foi concedida bolsa de doutorado pela CAPES. (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa PICDT).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação deste trabalho, amizade, apoio e, sobretudo, pela sabedoria a mim transmitida.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, por participar na Banca Examinadora da Tese.

À Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini, pelo apoio, e por participar na Banca Examinadora da Tese.

Ao Dr. Marcelo Palma Sircili, pelo apoio, e por participar na Banca Examinadora da Tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio, amizade e por participar na Pré-Banca e na Banca Examinadora da Tese.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pela amizade, pelo apoio durante o desenvolvimento da tese e, por me fazer gostar de Microbiologia.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Alessandra, Arlete, Gisele, Juliana, Luciana, Gerson, Gustavo, André, Bella, Guilherme, Fernanda e Tatiana, pela ajuda, amizade e apoio.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.

À Lúcia e Lourdes, por toda ajuda, dedicação, presteza e atenção.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa PICDT)

Aos meus amigos que sempre me apoiaram.

Aos meus pais, meus irmãos e meus sobrinhos, pelo carinho, compreensão e apoio durante a toda minha vida.

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO	12
3- MATERIAL E MÉTODOS	13
Amostras bacterianas.....	13
Preservação das amostras bacterianas.....	16
Teste de Adesão de Cultura de Células.....	17
Análise do Perfil Plasmidial.....	17
Extração do DNA Genômico.....	18
Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase.....	19
Reação de PCR.....	20
4- RESULTADOS	21
Resistência a Antimicrobianos.....	21
Teste de Adesão.....	24
Análise do Perfil Plasmidial.....	27
Reação de PCR.....	31
ERIC-PCR.....	31
REP-PCR.....	37
DRE-PCR.....	44
5- DISCUSSÃO	58
6- CONCLUSÕES	65
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I- Distribuição das amostras de <i>S. flexneri</i> e <i>S. sonnei</i> dos locais onde as amostras foram isoladas; as idades dos pacientes e resistência antimicrobiana.....	14
Tabela II- Iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	19
Tabela III- Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa de amostras de <i>Shigella sonnei</i>	24
Tabela IV- Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa de amostras de <i>Shigella flexneri</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Mapa do estado de São Paulo, demonstrando as diferentes cidades de onde foram isoladas as amostras de <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella sonnei</i> que fizeram parte do estudo	15
Figura 2- Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de <i>Shigella flexneri</i>	21
Figura 3- Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de <i>Shigella sonnei</i>	22
Figura 4- Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de <i>Shigella flexneri</i> e de <i>Shigella sonnei</i>	23
Figura 5- Fotos do teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2, cultivadas <i>in vitro</i> das amostras de <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella sonnei</i> (com D-manose e sem D-manose).....	26
Figura 6- Eletroforese em gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético de migração plasmidial de amostras de <i>Shigella flexneri</i>	27
Figura 7- Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético de migração plasmidial de amostras de <i>Shigella flexneri</i>	28
Figura 8- Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético de migração plasmidial de amostras de <i>Shigella sonnei</i>	29
Figura 9- Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético de migração plasmidial de amostras de <i>Shigella sonnei</i>	30
Figura 10- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de ERIC-PCR para amostras de <i>Shigella flexneri</i>	31
Figura 11- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de ERIC-PCR para as amostras de <i>Shigella sonnei</i>	32
Figura 12- Dendrograma de Similaridade para as amostras de <i>Shigella flexneri</i> para a metodologia ERIC-PCR.....	35
Figura 13- Dendrograma de similaridade para as amostras de <i>Shigella sonnei</i> para a metodologia ERIC-PCR.....	36
Figura 14- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de REP-PCR para amostras de <i>Shigella flexneri</i>	38
Figura 15- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de REP-PCR para as amostras de <i>Shigella sonnei</i>	39

Figura 16- Dendrograma de similaridade para as amostras de <i>Shigella flexneri</i> para a metodologia REP-PCR.....	42
Figura 17- Dendrograma de similaridade para as amostras de <i>Shigella sonnei</i> para a metodologia REP-PCR.....	43
Figura 18- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de DRE-PCR para amostras de <i>Shigella flexneri</i>	44
Figura 19- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de DRE-PCR para amostras de <i>Shigella sonnei</i>	45
Figura 20- Dendrograma de similaridade para as amostras de <i>Shigella flexneri</i> para a metodologia DRE-PCR.....	47
Figura 21- Dendrograma de similaridade para as amostras de <i>Shigella sonnei</i> para a metodologia DRE-PCR.....	48
Figura 22- Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético das reações de REP, DRE e ERIC-PCR respectivamente para amostras de <i>Shigella flexneri</i> para execução do dendrograma consenso.....	49
Figura 23- Dendrograma de similaridade consenso para as amostras de <i>Shigella flexneri</i> para as metodologias REP, DRE e ERIC-PCR.....	52
Figura 24- Gel de agarose (1,5%) Perfil eletroforético das reações de ERIC, DRE e REP-PCR para amostras de <i>Shigella sonnei</i> para execução do dendrograma consenso.....	53
Figura 25- Dendrograma de similaridade consenso para as amostras de <i>Shigella sonnei</i> para as metodologias ERIC, DRE e ERIC-PCR.....	54
Figura 26- Período de isolamento (em anos) das 30 amostras de <i>Shigella flexneri</i> isoladas de pacientes em diferentes cidades.....	56
Figura 27- Período de isolamento (em anos) das 30 amostras de <i>Shigella sonnei</i> isoladas de pacientes em diferentes cidades.....	57

RESUMO

Bactérias do “gênero” *Shigella* spp. apresentam-se como bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não formam esporos e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. De acordo com testes de aglutinação com anti-soros específicos, estas bactérias são classificadas em quatro sorogrupos: Sorogrupo A (*Shigella dysenteriae*), Sorogrupo B (*Shigella flexneri*), Sorogrupo C (*Shigella boydii*) e Sorogrupo D (*Shigella sonnei*).

Estas bactérias são responsáveis pela Shigelose ou Disenteria Bacilar enfermidade endêmica que anualmente acomete milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que mais de 70% de todos os casos ocorrem em crianças de 1 até 5 anos de idade, possuindo grande importância epidemiológica devido à alta morbi-mortalidade.

Os principais determinantes de patogenicidade neste grupo bacteriano são: o plasmídio de alto peso molecular, que determina o fenótipo invasivo desta espécie; genes cromossômicos, que regulam a expressão dos genes de virulência no plasmídio e a produção de uma exotoxina que atua destruindo a barreira de células epiteliais.

No Brasil, até então, não foram encontrados trabalhos publicados que comparem as diferentes amostras bacterianas de *Shigella* spp. isoladas de casos de Shigelose, relacionando suas características biológicas e estrutura clonal.

Sendo assim, neste trabalho, estudamos as características biológicas (sorotipagem, perfil de resistência a antimicrobianos, adesão e invasão, análise do perfil de DNA plasmidial) de diferentes amostras de *Shigella* spp. relacionando-as através de técnicas de Biologia Molecular (ERIC-PCR, REP-PCR e DRE-PCR) permitindo, assim, determinar a clonalidade epidemiológica destas. As amostras de *Shigella* spp. foram isoladas de diferentes surtos, de diversas cidades das regiões de Campinas e de São João da Boa Vista, e pertencem à coleção do Instituto Adolfo Lutz de Campinas.

ABSTRACT

Shigella spp are gram-negative, anaerobic facultative, non-motile, and non-sporulated bacilli of the *Enterobacteriaceae* family, responsible for “Shigellosis” or the Bacillary Dysentery (BD) disease, an important cause of worldwide morbidity and mortality. The pathogenic determinants of *Shigella* spp include high molecular weight plasmids responsible for the bacterial invasive capacity, as well as chromosomal genes encoding for different pathogenic factors such as exotoxins that destroy epithelial host cells. Little is known about the antibiotic resistance profiles and the population structure of *Shigella* species isolated from humans in Brazil. In this work, we have studied the antibiotic resistance profiles and the clonal structure of *Shigella* strains isolated from humans in different cities located in the region of Campinas, a city in the state of São Paulo, Brazil. We have also related the antibiotic resistance of these strains with the bacterial clonal groups determined by the molecular techniques ERIC, REP, and DRE-PCR. Our data indicate that many strains of *S. flexneri* and *S. sonnei* are multi-resistant, and our results also support the circulation of specific clones among the cities. These data indicate that the human sanitary conditions in the cities analyzed herein should be improved.

Key-Words: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, antimicrobial resistance, ERIC-PCR, REP-PCR, DRE-PCR

INTRODUÇÃO

As bactérias do "gênero" *Shigella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis, não possuindo atividade citocromo-oxidase, característica importante na diferenciação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* de outros bacilos gram-negativos fermentadores e não-fermentadores (Murray *et al.*, 1998). Fermentam glicose sem a produção de gás não fermentando a lactose (Murray *et al.*, 2003). Reduzem nitratos em nitritos, formam ácidos a partir de certos carboidratos, não produzem H₂S, urease, desaminases ou lisina descarboxilase (Jawetz *et al.*, 2000).

Relativamente, poucas propriedades bioquímicas são utilizadas para a distinção entre as "espécies" de *Shigella* como, por exemplo, a descarboxilação da ornitina, produção de indol e a utilização do manitol; sendo que *Shigella sonnei* é a única espécie que descarboxila a ornitina (Jawetz *et al.*, 2000).

Este bacilo foi isolado por Chantemesse e Widel (1888) e, detalhadamente estudado por Kiyoshi Shiga em 1898 (in: Lan & Reeves, 2002) sendo primeiramente denominado *Bacillus dysenteriae*. *Shigella* spp., entretanto, só teve seus biótipos e seus quatro sorogrupos, ou "espécies" definidos na década de 1940, sendo colocados em um grupo taxonômico distinto de *Escherichia coli* por apresentar importante relevância médica (Lan & Reeves, 2002).

A sorotipagem é eficiente para distinguir as diferentes "espécies". São reconhecidos sorotipos em *Shigella* spp. caracterizados pelo antígeno "O" de parede celular, codificado geralmente por genes cromossômicos (Shears, 1996) sendo divididas em quatro sorogrupos "O" (A – D).

O sorogrupo A (*Shigella dysenteriae*) é constituído por 13 sorotipos os quais, com poucas exceções, não apresentam relações sorológicas com os demais membros dos outros sorogrupos (Shears, 1996). O sorogrupo B: (*Shigella flexneri*) é constituído por seis sorotipos (Joklik *et al.*, 1994). O sorogrupo C: (*Shigella boydii*) é constituído por 18 sorotipos, sendo bioquimicamente similares aos do sorogrupo B, porém diferindo nos testes sorológicos (Joklik *et al.*, 1994). O sorogrupo D: (*Shigella sonnei*) possui apenas um sorotipo, dividido em biótipos *a, d, e, f e g* (Coimbra *et al.*, 2001).

O sorogrupo B predomina em áreas endêmicas; sendo responsável por aproximadamente 50% dos casos infecciosos. O sorogrupo A responde por 30% dos casos infecciosos, sendo um dos principais responsáveis por epidemias em países subdesenvolvidos (Bennish *et al.*, 1990). Casos de infecções pelo sorogrupo D são mais frequentes em países industrializados (Murray *et al.*, 1998), e o sorogrupo C é encontrado raramente em casos esporádicos.

A divisão do gênero em quatro espécies distintas foi proposta em 1974, com a publicação de trabalhos que mostravam dificuldade em distinguir fenotipicamente *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*. Mesmo possuindo antígenos específicos, ocorrem reações cruzadas entre os soros utilizados na sua identificação ocorrendo, também, reações cruzadas entre os soros de *Shigella* spp. e de *Escherichia coli* (Dodd & Jones, 1982). Em 1982, Dodd & Jones, estudando 102 linhagens de *Shigella* spp. e utilizando 192 caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, sugeriram que *Shigella* spp. formava um “cluster” distinto de *E. coli*, porém mais relacionado com *Yersinia* e *Proteus/Providencia*.

Através de experimentos de MLEE (“multilocus enzyme electrophoresis”) (Ochman *et al.*, 1983), experimentos de hibridação de DNA (Brenner *et al.*, 1972; 1973; 1982), ribotipagem (Rolland *et al.*, 1998), combinação de MLEE e seqüenciamento do gene *mdh* (Pupo *et al.*, 2000) e a combinação de outras técnicas (Liu *et al.*, 1995) sugeriu-se que *Shigella* spp. deveria ser considerada, parte do gênero *Escherichia coli* e não um gênero isolado.

No presente trabalho, adotamos a nomenclatura mais utilizada nos trabalhos científicos, permanecendo os termos gênero e espécie para os quatro soro-grupos de *Shigella* spp.

Shigella spp. é responsável por infecções intestinais denominadas Shigelose ou Disenteria Bacilar (Joklik *et al.*, 1994). Estimativas apontam que, por ano ocorrem 163 milhões de casos de Disenteria Bacilar, principalmente em crianças de um até cinco anos de idade, nos países em desenvolvimento, em áreas onde a qualidade de vida e a higiene são precárias. Estima-se que um milhão de mortes ocorra devido a estes casos. (Kotloff *et al.*, 1999; Venkatesan, 2001; Parsot, 2005)

Em adultos, a Disenteria Bacilar geralmente é autolimitada. Em idosos, homossexuais masculinos imunocomprometidos, populações de países em guerra, populações em condições de miséria e crianças, pode ser frequentemente severa, tendo por sintomas, febre alta, distúrbios neurológicos e disenteria muco-pio-sanguinolenta (Sansone, 2001; Thong *et al.*, 2005). A Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU) pode estar associada à infecção por *S. dysenteriae* e à ação da Shiga-toxina produzida por esta bactéria (Hale, 1985).

A transmissão da Disenteria Bacilar é fecal-oral, de mãos, água e alimentos contaminados. (Murray *et al.*, 1998). O período de incubação é de um a sete dias e a doença persiste por até duas semanas, aproximadamente. Diferentemente de outras bactérias enteropatogênicas, o “gênero” *Shigella* é conhecido por causar infecções em adultos com um número muito baixo de organismos ($10^1 - 10^2$ Unidades Formadoras de Colônias - U. F. C), o que explica ser esta bactéria responsável por surtos e epidemias em áreas populosas, principalmente em regiões com saneamento básico deficiente, onde a transmissão pessoa a pessoa ou água contaminada com fezes humanas, ocorre de forma mais acentuada (DuPont *et al.*, 1989). Esta baixa dose infectante é atribuída ao fato desta bactéria sobreviver com

sucesso à acidez estomacal do hospedeiro, provavelmente devido à expressão de genes de resistência a ácidos (Small *et al.*, 1994).

Os fatores moleculares e celulares da imunidade inata que erradicam a bactéria durante a fase primária da infecção e previnem a disseminação sistêmica têm sido amplamente estudados e os seus modos de ação caracterizados (Sansoneetti, 2001).

Uma série de descobertas tem permitido o progresso na compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais *Shigella* spp. se fixa às células epiteliais do intestino, invadindo, a seguir, as mesmas. (Sansoneetti, 2001).

Shigella spp. virulentas invadem as células epiteliais do cólon de forma irregular, penetrando através das células M, das placas de Peyer e em seguida, sendo fagocitadas e causando a morte, por apoptose, de macrófagos adjacentes (Sansoneetti *et al.*, 1996; Wassef *et al.*, 1989; Joklik *et al.*, 1994; Zychlinsky *et al.*, 1994; Lancellotti *et al.*, 2006). Os macrófagos infectados liberam uma alta concentração de interleucina-1 β , o que produz uma intensa resposta inflamatória, resultando em sangramento e acúmulo de muco encontrado nas fezes dos indivíduos acometidos (Suzuki & Sasakawa, 2001). As bactérias liberadas pelos macrófagos rompidos são capazes de invadir basolateralmente os enterócitos adjacentes e, por conseguinte, passar de uma célula à outra, levando à disseminação da infecção pelo trato intestinal do hospedeiro.

Acredita-se que o processo de patogênese de *Shigella* spp. seja mediado por genes cromossômicos e plasmidiais. (Sansoneetti, 2001; Sansoneetti & Phalipon, 1999).

Todos os isolados virulentos de *Shigella* spp. possuem um plasmídio de virulência (pINV) com peso molecular entre 120MDa a 140MDa (Hale, 1991; Sansoneetti, 2001), contendo os genes necessários à invasão. Este plasmídio foi inicialmente identificado em linhagens de *S. flexneri* 2a por Kopecko em 1979, e identificado também em outros sorotipos de *Shigella* (*S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* e *E. coli* enteroinvasora (Hale, 1991). Estudos envolvendo digestão enzimática e hibridação de DNA indicaram que o plasmídio de virulência das espécies de *Shigella* spp. e de *Escherichia coli* enteroinvasora são homólogos (Hale, 1991; Sansoneetti, 2001).

A forma virulenta destas bactérias dá-se graças à presença de uma estrutura lipopolissacarídica (LPS), denominada “tipo de colônia na fase I” e tem sido bem demonstrada em *S. sonnei* e *S. flexneri*. Estes microrganismos possuem plasmídios com peso molecular de 120MDa para *S. sonnei* e 140MDa para *S. flexneri*. A perda destes plasmídios leva à fase II e à formação de colônias rugosas não virulentas (Sansoneetti *et al.*, 1981; Sansoneetti *et al.*, 1982). No entanto, a maior parte dos fatores de virulência de *Shigella* spp. é codificada por genes encontrados num fragmento de 31kb de um plasmídio de alto peso molecular (220kb) (Sansoneetti *et al.*, 1981), presente no citoplasma das células

bacterianas e conhecido como plasmídio de virulência. Essa sequência conhecida como “região de invasão” é composta por dois loci gênicos distintos que codificam proteínas associadas com a invasão de células eucarióticas, e tem a função de induzir uma reestruturação do citoesqueleto celular na região de contato com a célula bacteriana (Maurelli *et al.*, 1984 e 1985; Sasakawa *et al.*, 1988).

Um dos loci é composto pelo operon *ipa*, com os genes que codificam as proteínas responsáveis pela invasão. Estas proteínas estão basicamente relacionadas com a ativação da polimerização de monômeros de actina. Foram identificados cinco quadros de leitura “ORF” (“*open reading frames*”) nessa região, que codificam as proteínas IpgC, IpaB, IpaC, IpaD e IpaA, cujas iniciais significam “antígenos protéicos de invasão”. Sasakawa *et al.*, em 1989, demonstraram que as bactérias mutantes para os genes *IpaB*, *IpaC*, *IpaD* são incapazes de ativar a mobilização de proteínas do citoesqueleto da célula hospedeira sendo, portanto, incapazes de desencadear um quadro infeccioso. Porém, mutantes de *IpaA* mantêm a virulência e a capacidade de invadir as células eucarióticas (Ménard *et al.*, 1993). Verificou-se também que as proteínas Ipa são secretadas somente após a ingestão da bactéria pelo organismo hospedeiro, pois os genes de virulência de *Shigella* spp. são expressos a 37°C e não a 30°C, fazendo com que as proteínas de virulência sejam expressas apenas quando estiverem no interior de organismos hospedeiros, e não no ambiente (Dorman *et al.*, 1995). O gene *ipgC*, situado no mesmo operon, codifica uma proteína de 17kDa (Ménard *et al.*, 1994) que impede a associação de IpaB e IpaC no citoplasma bacteriano. Essa proteína é considerada uma chaperona, pois assiste à montagem de IpaB e impede a associação precoce dessa com IpaC (revisado por Brocchi *et al.*, 1998).

Além do *locus ipa*, outro *locus* também encontrado no plasmídio de alto peso molecular parece estar relacionado com a capacidade de invadir células epiteliais. Esse *locus* é formado por aproximadamente 20 genes denominados *mxi* (“membrane expression of *ipa*”) e *spa* (“surface presentation antigen”), formando um “cluster” que é dividido em 2 operons (revisado por Brocchi *et al.*, 1998; Lancellotti *et al.*, 2006). Os genes *mxi/spa* codificam a maquinaria do sistema de secreção do tipo III, um sistema evolutivamente conservado em bactérias que, em *Shigella* spp., é responsável pela secreção das proteínas Ipa no citoplasma da célula hospedeira (Sasakawa *et al.*, 1988). As proteínas Ipa são sintetizadas e armazenadas no interior da célula bacteriana e secretadas pelo sistema de secreção tipo III quando em contato com a célula hospedeira. A associação entre IpaB e IpaD forma um complexo, e acredita-se que ele seja responsável pelo fluxo das proteínas Ipa através do sistema de secreção (Ménard *et al.*, 1996). Assim que são secretadas, as proteínas IpaB e IpaC, que são hidrofóbicas, se dirigem à membrana da célula hospedeira, formando um complexo na forma de poro que interage com a membrana da célula epitelial, fazendo com que as outras proteínas Ipa penetrem na célula hospedeira. No interior da célula hospedeira, as proteínas IpaA, IpaC e IpgD promovem um

rearranjo do citoesqueleto, principalmente da actina, provocando a formação de pseudópodos que engolfam a bactéria trazendo-a para o interior da célula hospedeira em uma vesícula macropinocítica. Desta forma o termo “invasão” não parece apropriado para o fato descrito acima. Como invasão se refere a uma penetração ativa da bactéria na célula hospedeira, este processo seria mais bem denominado “fagocitose induzida” (Salyers, 1994).

Já foram encontrados alguns receptores de adesão celular eucarióticos que seriam possíveis ligantes para IpaB, C e D, como por exemplo a integrina $\alpha 5\beta 1$, localizada na região basolateral das células epiteliais do intestino humano e CD44, o receptor da hialurona, um componente da matriz extracelular que também é expresso na região basolateral (Philpott *et al.*, 2000). Entretanto, esses receptores ainda não foram comprovados em testes *in vivo*, e nenhuma adesina, até o momento, foi isolada de *Shigella* spp. que poderia servir como molécula ligante destes receptores, o que levanta a questão da adesão ser ou não um processo importante para a invasão do epitélio intestinal.

Após a liberação das bactérias dos macrófagos na região sub-epitelial, ocorre a invasão da célula epitelial pela região basolateral. Após a invasão da célula hospedeira por fagocitose, a membrana do fagossomo é lisada, através da ação das proteínas IpaB, fazendo com que a bactéria seja liberada no citoplasma onde se multiplica rapidamente (High *et al.*, 1992). Em seguida, filamentos de actina se acumulam em um dos pólos da célula bacteriana. Esses filamentos se agrupam, formando uma cauda filamentosa que auxilia na locomoção da bactéria no interior do citoplasma da célula hospedeira em direção oposta ao pólo onde a cauda foi formada. A formação desta cauda se dá por um processo que envolve a formação de polímeros de actina e plasmina, outra proteína do citoesqueleto eucariótico, formando uma estrutura contrátil que dá força propulsora para a bactéria se locomover no interior da célula do hospedeiro (revisado por Brocchi *et al.*, 1998).

A indução da formação da cauda se dá pelo gene plasmidial *icsA* (VirG), sendo que a proteína IcsA também estaria relacionada com a hidrólise de ATP, necessário para a liberação de energia consumida nesse processo. A proteína IcsA é uma proteína de superfície celular associada ao LPS que é expressa somente em um dos pólos da célula bacteriana, permitindo que a polimerização da actina ocorra também de forma polarizada. Esta proteína promove a polimerização da actina através da interação de IcsA com a proteína da síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP) e com a vinculina, proteínas presentes no citoplasma dos enterócitos. Tal fato promove a polimerização da actina pela interação com o complexo de proteínas relacionadas com actina – Arp 2/3 (Suzuki & Sasakawa, 2001).

Em seguida a célula bacteriana, por intermédio das proteínas IpaB e IpaC, rompe a vesícula macropinocítica e, livre no citoplasma, se divide e locomove-se no interior da célula hospedeira com o auxílio da cauda filamentosa de actina. Nesse momento ocorre a necrose das células hospedeiras

causada pela liberação de citocinas, fruto da resposta inflamatória (Jennison & Verma, 2004). Quando atinge a membrana da célula endocítica, a bactéria provoca uma evaginação na célula epitelial adjacente. Após a formação da evaginação, ocorre a lise desta dupla membrana (membrana da célula em que a bactéria estava juntamente com a membrana da célula adjacente), e liberação da bactéria no interior da nova célula epitelial (revisado por Brocchi *et al.*, 1998). Neste processo, parece também estar envolvido o gene *IcsB* (Allaoui *et al.*, 1992). Além da proteína IcsB, E-caderina, presente na célula eucariótica e um importante componente da adesão intercelular, parece ser necessária para a passagem da bactéria de uma célula para outra. Tal fato foi evidenciado por Sansonetti *et al.* (1994).

Shigella spp. é um interessante paradigma co-evolucionário de adaptação, entre os genes plasmidiais e os genes de virulência cromossômicos. Ao lado dos genes de virulência plasmidiais que ditam e direcionam a interação da bactéria com as várias camadas celulares que formam a barreira epitelial, os genes cromossômicos também participam no processo patogênico.

Esta constatação foi exaustivamente documentada por experimentos de recombinação clássica entre cepas de *S. flexneri* e cepas receptoras de linhagem de laboratório *Escherichia coli* K12. Nestes experimentos, transferências conjugativas sucessivas de determinadas porções do cromossomo em vetores plasmidiais conferiram às cepas de *E. coli* um alto poder de virulência *in vivo* nos modelos de infecção (Sansonetti *et al.*, 1983).

Estes genes podem ser classificados em duas categorias:

- I. Genes que regulam a expressão dos genes de virulência nos plasmídios;
- II. Genes que são importantes para a sobrevivência da bactéria no trato intestinal.

Além disso, *S. dysenteriae* possui um gene cromossômico, denominado *stx*, que codifica uma exotoxina conhecida como “Shiga-Toxina (ShT)”.

O cromossomo de *Shigella* spp. apresenta aproximadamente 4.600.000 pares de base (Wei *et al.*, 2003) e apresenta pelo menos três ilhas de patogenicidade, que codificam fatores de virulência como, por exemplo, o LPS e genes dependentes de temperatura que regulam a expressão de genes plasmidiais (Jennison & Verma, 2004).

As “espécies” de *Shigella* spp. são capazes de produzir citotoxinas ao penetrarem e proliferarem no interior das células do íleo terminal (Sears & Kaper, 1996). Essas toxinas são responsáveis pela inibição da síntese protéica e morte celular e pelo distúrbio hidrossalino responsável pela fase diarreica da infecção. *Shigella dysenteriae* é a única “espécie” capaz de produzir, além destas citotoxinas, uma enterotoxina ou exotoxina, codificada por um operon cromossômico *stxA* e *stxB*, denominada “Shiga-Toxin”(ShT) (Frankel *et al.*, 2001). Esta enterotoxina é constituída de duas subunidades (A e B), sendo que a subunidade A responsável pela inibição da síntese protéica e a subunidade B, responsável pelo reconhecimento e ligação em receptores no epitélio celular (Reisbig *et al.*, 1981). A partir daí a

subunidade A é transportada para o interior da célula por via endocítica. Evidências sugerem que a ligação com os receptores é um pré-requisito para a expressão da atividade biológica e que o máximo da atividade de ShT é dose dependente do receptor. A inibição da síntese protéica (na subunidade ribossômica 60S) é caracterizada como efeito tóxico primário na célula do hospedeiro sem afetar a estrutura ribossômica bacteriana (Olsnes, 1981). Sendo assim, a toxina Shiga, além de agravar o quadro inflamatório (Sears & Kaper, 1996), apresenta ação neuroenterópica (Bier, 1984) e causa a síndrome hemolítica urêmica (SHU), provocando insuficiência renal (Salysers, 1994).

Disenteria causada por *Shigella* spp. constitui um importante problema de saúde pública em países industrializados e em desenvolvimento. Apesar da Disenteria Bacilar ser usualmente autolimitada, a antimicrobiano-terapia efetiva nessa enfermidade reduz a duração e a gravidade da disenteria, como também diminui o período em que o paciente passa excretando fezes contaminadas no ambiente, reduzindo assim a disseminação da bactéria, podendo diminuir os índices de morbidade e mortalidade (Sidrim *et al.*, 1998; Jennison & Verma, 2004).

O uso de antimicrobianos de largo espectro como as sulfonamidas, cloranfenicol, ampicilina e tetraciclina parecem eliminar grupos bacterianos sensíveis residentes no intestino, selecionando bactérias resistentes. A terapia com antimicrobianos pode, também, selecionar bactérias com fatores (plasmidiais) R que transferem estes fatores para cepas de *Shigella* spp. sensíveis, o que resulta numa rápida aquisição de resistências múltiplas (Sidrim *et al.*, 1998).

Métodos de tipagem molecular ou genotípicos são importantes na elucidação das rotas de transmissão de patógenos microbianos (Pfaller *et al.*, 1996). Pelo monitoramento fechado da variabilidade genética, distâncias filogenéticas podem ser calculadas, permitindo um melhor discernimento das linhagens estudadas (Karlin *et al.*, 1994). Análises genéticas detalhadas produzem evidências da plasticidade genotípica e evolutiva das bactérias, caracterizando a sua adaptação aos mais variados ambientes. Este tipo de informação pode ser utilizado no cenário clínico para discriminar os tipos bacterianos responsáveis por surtos ou epidemias (Renders *et al.*, 1996).

Os métodos moleculares mais empregados hoje em dia, utilizam as mais variadas técnicas, como por exemplo: perfil plasmidial, marcadores de DNA, seqüências repetitivas ou aleatórias do genoma bacteriano amplificadas por PCR, hibridização do DNA com oligonucleotídeos e marcadores moleculares utilizando-se endonucleases de restrição. A premissa básica de todos esses métodos reside no fato de que amostras bacterianas relacionadas epidemiologicamente apresentam um precursor comum.

Análises dos diferentes perfis plasmidiais, após eletroforese em gel de agarose, foram utilizadas para a caracterização de cepas epidêmicas patogênicas e nas investigações de surtos causados por *Shigella* spp. (Liu *et al.*, 1995).

Estudos prévios demonstraram que *S. sonnei* abriga uma população heterogênea de plasmídios que pode variar de dois até mais de dez (Haider *et al.*, 1985). Em contraste, Prado *et al.* (1987), analisando o perfil plasmidial de isolados de *Shigella sonnei* do México e de Houston, no Texas - USA, verificaram que a maioria das cepas possuía o mesmo padrão de perfis plasmidiais.

Seqüências de DNA não codificantes e repetitivas, estão presentes em diferentes posições do genoma bacteriano, sendo mantidas sob constante ação da seleção natural que promove mutações e recombinações dessas regiões gerando diversos tipos de polimorfismos de seqüência, de posição e de número (Versalovic *et al.*, 1991).

Versalovic *et al.* (1991) estudando a distribuição de seqüências repetidas de DNA em bactérias, examinaram os elementos Palindrômicos Repetitivos Extragênicos (REP). A seqüência REP é uma seqüência palindrômica de 38 nucleotídeos com uma região variável central de 5pb flanqueadas por duas ramificações complementares entre si, que possuem capacidade de formar estruturas “stem-loop” (em alças) estáveis na transcrição do RNA. Essas seqüências são geralmente encontradas repetidas vezes por todo o genoma bacteriano, inseridas em regiões entre os genes, dentro ou fora de operons, formando “clusters”, com cerca de 563 seqüências em 295 “clusters” espalhadas pelo genoma de bactérias como *E. coli* (Dimri *et al.*, 1992). Algumas funções foram propostas para essas seqüências, como a de regulação da expressão gênica por meio de tradução diferencial em operons policistrônicos e estabilização de mRNA (Newbury *et al.*, 1987 e 1987a), sugeridas devido à conformação estrutural na forma de alça com “loop” dessas seqüências REP. Porém, estes elementos não estão sempre presentes nas mesmas posições intergênicas entre diferentes espécies de organismos, sugerindo que elas não sejam essenciais para o processo de expressão gênica. Tal processo provavelmente seria uma função secundária dessas seqüências. Reforçando esta idéia, enzimas como a DNA girase (Yang *et al.*, 1988) e DNA polimerase (Gilson *et al.*, 1990) foram encontradas ligando-se às seqüências REP, sugerindo um possível papel estrutural para essas seqüências, as quais poderiam exercer um papel importante no dobramento do nucleóide bacteriano em domínios de super enovelamento (Lupski & Weinstock, 1992). Bocard & Prentki (1993), descreveram que as seqüências REP adjacentes inseridas em seqüências repetitivas mosaico (BIMEs) poderiam servir de sítio de ligação para o fator de integração ao hospedeiro (IHF – Integration Host Factor) de *E. coli*. IHF, por sua vez, auxiliaria na ligação e modulação da atividade da enzima DNA girase, auxiliando no desenovelamento da dupla fita de DNA durante o processo de transcrição. Com isso, múltiplas funções têm sido descritas para esta região altamente conservada: dispersão dos elementos REP, incluindo a função no término da transcrição; estabilidade do RNA mensageiro e o domínio da organização cromossomal *in vivo*.

Outra seqüência repetitiva encontrada em genomas de organismos da família *Enterobacteriaceae* é a unidade repetitiva intergênica (IRU – “Intergenic Repeat Unit”), mais

conhecida como Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC – “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) (Sharples & Lloyd, 1990). Essa seqüência palindrômica de aproximadamente 127 nucleotídeos está também localizada em regiões não codificantes do genoma bacteriano, ou seja, situa-se entre genes transcritos dentro ou fora de operons, com sua posição variando em relação à posição das seqüências de terminação e promotoras dos genes, fazendo com que apenas uma pequena parte destas seqüências ERIC seja transcrita na forma de RNA (Sharples & Lloyd, 1990). Quando a seqüência se encontra antes de uma seqüência de terminação de um determinado gene, ela é transcrita junto com o gene que a acompanha. Dessa forma, a parte do mRNA correspondente às seqüências ERIC formariam uma estrutura na forma de alça (devido à complementaridade entre algumas seqüências invertidas), a qual poderia interferir com a ligação do mRNA aos ribossomos, influenciando na tradução do mesmo, sugerindo, desta maneira, uma função regulatória para os elementos ERIC (Sharples & Lloyd, 1990). Seqüências ERIC poderiam ainda proteger a região 3’ do mRNA contra digestão por exonucleases, assim como foi proposto para as seqüências REP, e dessa forma aumentar a expressão de genes que estejam a montante dessas seqüências. Ainda não foi descrita nenhuma proteína que poderia se ligar às seqüências ERIC, tal como descrito para REP. Porém, devido à natureza conservada deste elemento em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, sugere-se que ele possa designar um sinal estrutural para o DNA destes microrganismos (Sharples & Lloyd, 1990).

A seqüência consenso ERIC não parece estar relacionada com os elementos REP, e ainda não se sabe claramente os mecanismos de herança desses elementos. Eles não são relacionados a nenhuma outra seqüência repetitiva conhecida como, por exemplo, seqüências de inserção, transposons ou genes estruturais de RNA, e, além disso, são muito pequenos para poderem codificar uma transposase que poderia mediar sua transposição (Sharples & Lloyd, 1990). Entretanto, essas seqüências poderiam ser resquícios de elementos transponíveis, o que poderia sugerir sua origem em comum para vários representantes de eubactérias. Como essas seqüências já foram encontradas tanto em representantes do domínio das eubactérias como em archeobactérias (*Halobacterium halobium*), sugere-se que a origem desses elementos seja anterior ao surgimento da linhagem de bactérias Gram-negativas entéricas (Versalovic *et al.*, 1991).

Em 1991, Versalovic e colaboradores sugeriram a utilização dessas seqüências repetitivas ERIC e REP na tipagem molecular de microrganismos. Como essas seqüências estão presentes em muitas espécies de eubactérias, elas poderiam ser utilizadas como sítios de ligação para iniciadores específicos em reações de PCR, na produção de “fingerprints” (marcadores moleculares) dos diferentes genomas bacterianos (Versalovic *et al.*, 1991). Nessa reação, os iniciadores se ligariam às seqüências repetitivas e, dependendo da distância entre duas destas seqüências adjacentes (no máximo 5kb dependendo da

DNA polimerase utilizada na reação), a porção de DNA compreendida entre elas seria amplificada pela reação de PCR. Essas diferentes seqüências amplificadas seriam visualizadas como bandas de diferentes tamanhos em um gel de agarose. Como diferentes isolados bacterianos apresentam polimorfismo quanto ao número e posição dessas seqüências, esse padrão de bandas resultante desta reação de PCR poderia ser utilizado para diferenciá-los. A comparação entre os perfis eletroforéticos de diferentes isolados poderia, portanto, ser utilizada para determinar o grau de similaridade entre as amostras testadas. Considerando que o perfil de marcadores moleculares gerado através desta reação é reprodutível e, uma mesma linhagem bacteriana testada repetidas vezes apresenta sempre o mesmo padrão, pode-se dizer que este método de tipagem é um método eficiente, atendendo os critérios gerais dos métodos de tipagem e ainda, que o padrão de bandas obtido é específico para cada amostra em questão (Lupski & Weinstock, 1992).

A distribuição dos elementos REP, ERIC em diversos genomas procarióticos, inclusive em *Shigella spp.*, foi examinada por Versalovic *et al.* (1991) pelo método de PCR. Tais análises revelaram que as distâncias entre seqüências REP, ERIC possuem um padrão específico para diferentes cepas e espécies bacterianas. Este estudo demonstrou que as seqüências REP, ERIC estão presentes em muitas espécies diferentes e podem ser utilizadas para gerar diferentes padrões com reações de PCR para os diversos genomas bacterianos, constituindo-se, assim, em técnicas simples, baratas e rápidas para a caracterização de microrganismos patogênicos (Versalovic *et al.*, 1991).

Riley *et al.* (1995) estudou a distribuição de seqüências repetidas de DNA em *Mycobacterium tuberculosis* examinando os elementos Duplos Repetitivos (DRE), elementos estes que caracterizam a repetição de seqüências ricas em bases nitrogenadas “G-C” distribuídas no cromossoma bacteriano. Este método demonstrou ser um importante método na aplicação de estudos epidemiológicos, pois esses elementos estão presentes em espécies diferentes o que torna o DRE-PCR um método rápido para a subtipificação de amostras bacterianas.

A cidade de Campinas possui, aproximadamente, 1,2 milhões de pessoas, e, juntamente com outras cidades que fazem parte da região metropolitana de Campinas, constitui um dos pólos industriais, tecnológicos, educacionais e culturais do Estado de São Paulo e, embora, esta região metropolitana possua um elevado índice de desenvolvimento humano, ainda possui bolsões de pobreza que são locais potenciais para a ocorrência e disseminação de doenças infecto-contagiosas potencialmente fatais, como é o caso da Shigelose, o que nos levou a fazer um levantamento epidemiológico das amostras isoladas de casos de Shigelose nesta região, mostrando que mesmo

sendo uma das regiões mais desenvolvidas do estado, casos de doenças infecto-contagiosas acontecem com elevada frequência.

OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade fenotípica e genotípica (clonal) de 60 amostras de *Shigella* spp., sendo 30 de *Shigella flexneri* e 30 de *Shigella sonnei*, isoladas de diferentes casos infecciosos que ocorreram nas regiões de Campinas e de São João da Boa Vista e que fazem parte do acervo do Instituto Adolfo Lutz, de Campinas.

As características fenotípicas determinadas foram: sorotipagem, perfil de resistência a antimicrobianos, adesão e invasão de células (HeLa, HEp-2) cultivadas *in vitro* e análise do perfil de DNA plasmidial, enquanto que a variabilidade genotípica foi determinada através dos perfis eletroforéticos obtidos através das técnicas, isoladas e combinadas, de ERIC-PCR, REP-PCR e DRE-PCR.

Os resultados obtidos foram analisados quanto às características epidemiológicas destas linhagens na região metropolitana de Campinas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras Bacterianas

Neste estudo foram utilizadas 60 amostras de *Shigella* spp. de pacientes apresentando quadro de Disenteria Bacilar. As amostras pertencem ao sorogrupo *Shigella flexneri* (30) e *Shigella sonnei*, (30) e são provenientes de surtos ocorridos em diferentes cidades do Estado de São Paulo (Tabela 1 e Figura 1). As amostras, assim como os seus sorogrupos e os perfis de resistência a antimicrobianos, foram gentilmente cedidas pela Dra. Marilu Mendes Moscardini Rocha, Pesquisadora Científica do Departamento de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

A identificação, origem e o perfil de resistência de cada amostra estão descritos na tabela 1.

O período de coleta das amostras está representado nas figuras 26 e 27.

Amostras de <i>S. flexneri</i>	Data do Isolamento	Cidade	Idade do paciente	Perfil de Resistência antimicroniana	Amostras de <i>S. sonnei</i>	Data do Isolamento	Cidade	Idade	Perfil de Resistência antimicroniana
Sf1A	02/11/87	SJBV	44	AP, ET, SUT	Ss1	14/02/97	MG	23	ET, SUT,TT
Sf1B	02/11/87	SJBV	12	AP, ET, SUT	Ss2	14/05/97	BP	15	AP, ET, SUT
Sf2	03/10/89	C	2	CO, ET, SUT, TT	Ss3	15/10/98	L	11	ET, SUT, TT
Sf3	23/04/90	J	35	ET, SUT	Ss4	24/06/99	C	10	SUT, TT
Sf4	24/11/97	C	8m	AP, CO, ET, SFT,TT	Ss5	10/03/00	C	2	AP, SUT, TT
Sf5	30/12/97	C	6m	AP, CO, ET, SFT,TT	Ss6	23/05/00	C	7m	ET, SUT, TT
Sf6	11/02/98	C	2	AP, CO, ET, SFT,TT	Ss7	31/05/00	C	87	ET, SUT, TT
Sf7	16/09/98	C	4	AP, ET, SUT,TT	Ss8	02/06/00	C	2	ET, SUT, TT
Sf8	21/01/99	C	1	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss9	25/01/01	COS	2	SUT, TT
Sf9	17/02/99	C	70	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss10	02/03/01	C	9	ET, SUT, TT
Sf10	29/03/99	C	29	CO, ET, SUT,TT	Ss11	02/03/01	C	3	SUT, TT
Sf11	30/09/99	C	11m	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss12	08/03/01	C	3	ET, SUT,TT
Sf12A	12/11/99	I	50	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss13	10/05/01	C	1	SUT, TT
Sf12B	12/11/99	I	40	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss14	29/06/01	C	-	SUT, TT
Sf12C	16/11/99	I	4	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss15	05/07/01	C	-	SUT, TT
Sf12D	30/11/99	I	19	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss16A	28/02/02	C	4	SUT, TT
Sf13	14/02/00	C	8m	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss16B	28/02/02	C	3	SUT, TT
Sf14	02/05/00	C	5	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss16C	28/02/02	C	5	SUT, TT
Sf15	15/05/00	C	3	AP, CF,CO, ET, SUT,TT	Ss16D	28/02/02	C	4	SUT, TT
Sf16	05/06/00	C	4	AP, ET, SUT,TT	Ss16E	28/02/02	C	5	SUT, TT
Sf17	10/07/00	C	6m	AP, ET, SUT,TT	Ss16F	28/02/02	C	-	SUT, TT
Sf18	10/07/00	C	-	AP, ET,TT	Ss16G	07/03/02	C	6	SUT, TT
Sf19	15/08/00	C	1,5	AP, CO, ET, SUT,TT	Ss16H	11/03/02	C	42	SUT, TT
Sf20	10/11/00	C	5	AP, CO, TT	Ss16I	26/03/02	C	6	SUT, TT
Sf21	14/11/00	C	50	AP, CO, SUT, TT	Ss17	06/03/02	C	5	SUT, TT
Sf22	21/12/00	C	5	AP, CO, ET, SUT, TT	Ss18	15/03/02	C	-	SUT, TT
Sf23	16/01/01	C	40	AP, CO, ET, SUT, TT	Ss19A	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
Sf24	22/01/01	C	10m	ET, TT	Ss19B	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
Sf25	18/06/01	MG	49	SUT	Ss19C	18/04/02	VIN	-	SUT, TT
Sf26	27/12/01	C	3	AP, CO, TT	Ss20	03/05/02	C	-	SUT, TT

Tabela 1: Identificação, origem, perfil de resistência das amostras de *S. flexneri* e *S. sonnei* que fizeram parte deste trabalho.

Cidades: SJBV = São João da Boa Vista ; C = Campinas; J = Jundiá; I = Itapira; MG = Mogi Guaçu; BP = Bragança Paulista; L = Limeira; COS = Cosmópolis; VIN = Vinhedo. **Antimicrobianos:** AP = Ampicilina, CF = Cefalotina, CO = Cloranfenicol, ET = Estreptomicina, SUT = Sulfametoxazol, SFT = Sulfazotrim, TT = Tetraciclina.



Figura 1: Mapa do Estado de São Paulo, demonstrando as diferentes cidades de onde foram isoladas as amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* que fizeram parte do estudo.

2. Preservação das amostras bacterianas

As amostras foram cultivadas em meio LB (Oxoid) líquido (Miller, 1972). Após incubação de 18-24 horas a 37°C, 450 µL deste meio contendo as bactérias, foram transferidos para um tubo criogênico de 1,5 mL e a este adicionado 450 µL de solução de Hogness (Werner *et al.*, 1997) , a suspensão foi homogeneizada em agitador tipo “vortex” (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e a suspensão armazenada em freezer a - 70°C.

3. Teste de Adesão Bacteriana em células cultivadas in vitro (HeLa e HEp-2)

Preparo das amostras bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo, bem como as linhagens controles foram semeadas em meio LB líquido e incubadas por 18 horas a 37°C em estufa bacteriológica (Fanen, São Paulo – SP, Brasil).

Cultivo das Células

Para realização do teste de adesão bacteriana foram utilizadas linhagens celulares HeLa e HEp-2 armazenadas em ampolas de criogenia em nitrogênio líquido, em soro fetal bovino (SFB) (Nutricell®) contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma®). Para a realização do teste uma ampola foi descongelada rapidamente e as células lavadas por centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, as células foram inoculadas em uma garrafa de cultura contendo meio mínimo de Eagle (Nutricell®) suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37°C por 72 horas em estufa de CO₂ (Fanen, São Paulo – SP, Brasil).

Após a formação da monocamada celular na garrafa, o meio mínimo de Eagle foi removido e as células foram tripsinizadas. Com o desprendimento total das células, um volume de meio Eagle suplementado com 10% de SFB foi adicionado para uma quantidade final de 25-30 mL. A seguir, 1,0 mL da suspensão celular (1.10^5 células/mL) foi adicionado em cada orifício de uma placa de cultura celular contendo uma lamínula esterilizada. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em microscópio invertido. A cultura foi considerada ideal para o teste quando as células apresentavam cerca de 50%, ou mais, de confluência da monocamada e, apresentavam baixa refringência, sem deslocamento. Após este período a placa foi lavada 3 vezes com tampão salina fosfatada - PBS – (Cloreto de Sódio (J. T. Baker, México) – 8,0 g; Cloreto de Potássio (J. T. Baker, México) - 0,20 g; K₂HPO₄ (J. T. Baker, México) – 20 g e Na₂HPO₄ (J. T. Baker, México) – 2,89 g e H₂O qsp 1000 mL – (0,01M - pH 7,4).

Teste de Adesão

O teste de adesão em células seguiu a metodologia descrita por Scaletsky *et al.* (1984). Após a lavagem da microplaca em tampão PBS, 1,0mL de meio Eagle contendo 2% de soro fetal bovino foi adicionado em cada orifício. Em seguida, cada amostra bacteriana, cultivada por 18 horas em meio LB foi adicionada a cada orifício na quantidade de 40µL. A microplaca foi incubada por 3 a 6 horas a 37° C e, após este período foi lavada 10X com 1,0 mL de PBS 0,01 M (pH 7,4) por orifício. As lamínulas foram fixadas em metanol (Quimex, Brasil) por 10 minutos e coradas com corante de May Grüwald – corante May Grüwald 2,0gramas (Sigma®) e Metanol – 10 mL por 10 minutos e corante de Giemsa – (Giemsa (Sigma®) 1 grama, Metanol, 66 mL e glicerina (Merck, USA) por 10 minutos. As lamínulas foram retiradas de cada orifício da microplaca e montadas em lâminas para microscopia em Entellan (Merck, USA).

O resultado da adesão bacteriana foi visualizado em microscopia óptica em aumentos finais de 400X e 1.000X. Para a realização do teste foram adicionadas 100µL (células/mL) da suspensão bacteriana.

Obs.: Os testes foram realizados com tratamento e sem tratamento com D-manose 1% (Gibco BRL, EUA) (inibição da fímbria tipo I) e o tempo de adesão de 6 horas.

4. Análise do Perfil Plasmidial

O método para extração do DNA plasmidial foi o mesmo utilizado por Kado & Liu (1981). As amostras bacterianas foram inoculadas em meio LB, incubadas a 37° C por 12 a 18 horas. A seguir 1 mL do cultivo bacteriano foi transferido para um tubo de microcentrífuga tipo “eppendorf” e centrifugado por 12.000g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi ressuscitado em 100 µL de solução I (Tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0 (250 µL); solução de EDTA 0,5 M pH 8,0 (200 µL); glicose 0,5 M (1.000 µL); lisozima (0,04 g); e H₂O destilada/deionizada qsp 10,0 mL) gelada e mantido em banho de gelo por 5 minutos. A seguir 200 µL da solução II (NaOH 10 N (200 µL); SDS 10% (100 µL); H₂O destilada/deionizada qsp 10,0 mL) foram adicionados e o conteúdo foi suavemente homogeneizado sendo, a seguir deixado em banho de gelo por cerca de 2 a 3 minutos. Após este período 150 µL da solução III (Acetato de Sódio 5 M (60,0 mL); Ácido Acético Glacial (11,5 mL); H₂O destilada/deionizada qsp 28,5 mL) foram adicionados ao conteúdo do mesmo e novamente invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por tempo mínimo de 15 minutos. A suspensão foi centrifugada por 12.000g por 4 minutos, sendo 400 µL do sobrenadante transferidos para outro tubo de microcentrífuga tipo “eppendorf”. A esse volume, 2,5 volumes (1000 µL) de etanol absoluto gelado (-20° C), sendo o tudo invertido suavemente para a mistura dos conteúdos e, então mantido a -20° C por

tempo mínimo de 30 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12.000g por 4 minutos, ressuspensionado com 20µL de água deionizada esterilizada e mantido a – 20° C.

Para a corrida eletroforética 10 µL do material extraído foram misturados a 3 µL de tampão de ressuspensão de DNA (solução de sacarose a 50%, adicionados a esta, os corantes de azul de bromofenol e xileno cianol numa concentração final de 0,25%) e a mistura aplicada em gel de agarose a 0,7% (Sambrook *et al.*, 1989). O gel foi corado com brometo de etídio e bandas de DNA foram visualizadas através de um transluminador de UV. Os géis de agarose foram analisados pelo sistema Kodak Digital Science™ 1D Image Analysis Software, para o cálculo do peso molecular dos fragmentos encontrados.

5. Extração de DNA Genômico

A extração de DNA genômico das amostras de *Shigella* foi realizada de acordo com o método descrito por Ausubel *et al.*, 1987, com algumas modificações.

As amostras foram inoculadas em 4 mL de meio LB líquido (Oxoid), e incubadas a 37°C (Fanen, São Paulo – SP, Brasil) por 24 horas. Um mL de cada suspensão bacteriana foi centrifugado em microcentrífuga (Incibrás – Instrumentação Científica Brasileira, São Paulo – SP, Brasil) (12.000 rpm, 3 min). Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos contendo as células bacterianas ressuspensionados em 500 µL de Tampão TE – 1 mM Tris-HCl pH 8,0 (Invitrogen-Life Technologies, EUA), 0,5 mM EDTA pH 8,0 (USB-Amersham Life Science, EUA).

As suspensões foram centrifugadas (12.000 rpm, 2 min), repetindo-se a operação por mais uma vez. Em seguida os sobrenadantes foram descartados e aos sedimentos foram adicionados 400 µL de tampão T.E. 1X, 49 µL de lisozima (10 mg/mL) (Invitrogen-Life Technologies, EUA) e 1 µL de RNase (10 mg/mL) (Invitrogen-Life Technologies, EUA). A mistura foi homogeneizada e colocada em banho termostático a 37°C (Nova Técnica, Piracicaba – SP, Brasil) por 10 minutos. A esta suspensão foram adicionados 100 µL de solução 5M de NaCl (J.T.Baker, México) e 100 µL de CTAB/NaCl (Invitrogen-Life Technologies, EUA J.T.Baker, México), sendo a mesma homogeneizada até a formação de um líquido com aspecto leitoso. A mistura foi colocada em banho termostático a 65°C por 10 minutos e, em seguida foram adicionados 750 µL de uma solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) USB/Quimex, Brasil/Mallinckrodt, EUA). A mistura foi agitada por pelo menos 10 segundos e centrifugada à temperatura ambiente (12.000 rpm por 5 min), obtendo-se ao final a formação de três fases com o DNA localizado na fase aquosa. O sobrenadante aquoso foi transferido para um tubo de polipropileno para microcentrífuga com capacidade para 1.500 µL esterilizado e a esse, foram adicionados 0,6 volumes de Isopropanol (Quimex, Brasil). Em seguida, a mistura foi

mantida a -20°C por 30 min, sendo centrifugada à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de Etanol (Quimex, Brasil) 70% e seco à temperatura ambiente. Completado o processo de secagem, o DNA, foi ressuspensionado em 100 μL de água deionizada esterilizada.

Após o término da técnica de extração de DNA, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8%) (Invitrogen-Life Technologies) conduzida a 80 Volts, para avaliação da qualidade do DNA.

A concentração e pureza do DNA extraído foram determinadas por leitura em espectrofotometria (λ 260 nm e λ 280 nm), utilizando-se o seguinte cálculo:

Concentração de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = A 260 nm X 50 X fator de diluição

Pureza do DNA = A 280 / A 260 nm; foram utilizados aqueles que apresentaram valores entre 1,50 a 1,80.

6. Amplificação do DNA pela Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

As reações de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Versalovic *et al.*, 1991); REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic - Versalovic *et al.*, 1991), DRE-PCR (Double-Repetitive-Element – Riley *et al.*, 1995), foram realizadas em triplicata utilizando-se um termociclador Gene Amp System PCR 9700 – Perkin Elmer Cetus.

Os iniciadores utilizados podem ser visualizados na tabela 2, a seguir:

Tabela 2: Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Temperatura de Anelamento $^{\circ}\text{C}$	Referência
ERIC 1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	52	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC 2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	52	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP 1R1	III ICG ICG ICA TCI GGC	40	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP 2	ICG ICI TAT CIG GCC TAC	40	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
DRE – Ris1	GGC TGA GGT CTC AGA TCA G	56	Riley <i>et al.</i> , 1995
DRE – Ris2	ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC	56	Riley <i>et al.</i> , 1995
DRE – Pntb1	CCG TTG CCG TAC AGC TG	56	Riley <i>et al.</i> , 1995
DRE- Pntb2	CCT AGC CGA ACC CTT TC	56	Riley <i>et al.</i> , 1995

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

7. Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em volume final de 100 µL contendo 50 pmol de cada iniciador (Invitrogen-Life Technologies), 100 ng do DNA genômico, 1,25 mM de cada dNTP (Eppendorf), 2,5 unidades de klenTaq1™ DNA Polimerase (AB Peptides, Inc. EUA), 4 mM de MgCl₂ (Gibco BRL), em tampão de reação apropriado provido com a enzima. Para se atingir o volume final de 100 µL por tubo, completou-se com água deionizada esterilizada (Gibco BRL).

Para a amplificação, a mistura de DNA genômico, iniciadores, dNTP, MgCl₂ e tampão foi, inicialmente, desnaturada por aquecimento a 94°C por 7 minutos, 2,5 unidades da enzima foram adicionadas e a amplificação foi então realizada por 30 ciclos constituídos pelos seguintes passos: **1)** desnaturação a 94°C, por 30 segundos, **2)** anelamento a 40°C para REP, a 52°C para ERIC e a 56°C para DRE-PCR por 1 minuto e **3)** extensão a 65°C por 8 minutos. O último passo da reação consistia de uma extensão final de 65°C por 10 minutos.

Após o término dos ciclos das reações de amplificação, os produtos finais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen-Life Technologies) na concentração de 1,5% em cubas horizontais (Horizon 11.14, Gibco BRL – Life Technologies) a 80 volts, utilizando-se um tampão TEB (Tris-HCl / Ácido Bórico / EDTA- Invitrogen-Life Technologies, EUA / J.T. Baker, México / USB-Amersham Life Science, EUA). Aproximadamente 10 µl da reação de PCR foram aplicados na canaleta juntamente com 5 µl do tampão de ressuspensão 5X (50% de Sacarose (Gibco BRL, EUA), 0,25% de Xileno Cianol (Gibco BRL, EUA), 0,25% de Azul de Bromofenol (Gibco BRL, EUA)).

Após a eletroforese, o DNA presente no gel foi corado com Brometo de Etídio 0,5 µg/mL (Gibco BRL), visualizado sob luz ultravioleta através de um transluminador de mesa (UPV) e fotografado pelo sistema software Kodac 1D Science.

Os resultados foram submetidos à análise de similaridade genética foi realizada utilizando – se o *software* POPGENE (versão 1,31 – Yeh *et al.*, 1999) e o *software* NTSYSpc versão 2.10m (Applied Biostatistics Inc.) na qual foram gerados dendrogramas de similaridade genética. Para a análise de similaridade foram utilizados o coeficiente de distância genética BAND e o algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages), (Rohlf, 2000).

RESULTADOS

Resistência a Antimicrobianos

Analisando-se os resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobianos (tabelas 1 e 2) verificou-se que as amostras de *Shigella flexneri* apresentaram 83,33% de resistência a Ampicilina (AP), 3,33% das amostras ofereceram resistência a Cefalotina (CF), 70% resistência ao Cloranfenicol (CO), 86,67% das amostras mostraram-se resistentes a Estreptomicina (ET), 10% ao Sulfazotrim (SFT), 76,67% ao Sulfametoxazol (SUT) e 86,67% das amostras testadas foram resistentes à Tetraciclina (TT). Como podemos verificar no gráfico abaixo.

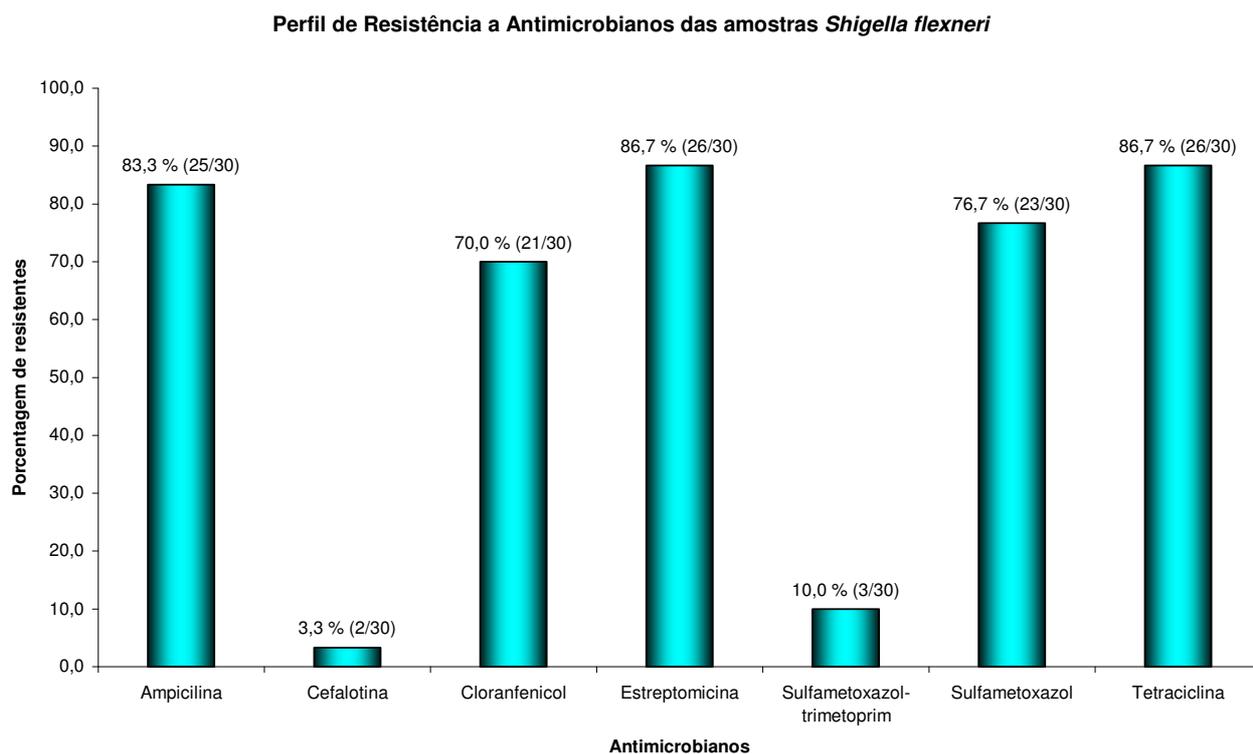


Figura 2: Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de *Shigella flexneri*

As amostras de *Shigella sonnei* mostraram um perfil de resistência distinto, sendo que para o antimicrobiano Ampicilina (AP) somente 6,6% das amostras ofereceram resistência, 26,67% mostraram-se resistentes frente à Estreptomicina (ET), 96,67% foram resistentes a Tetraciclina (TT) e 100% das amostras estudadas ofereceram resistência ao Sulfametoxazol (SUT). Portanto, para os antimicrobianos Cloranfenicol, Cefalotina e Sulfazotrim, nenhuma amostra de *S. sonnei* mostrou-se resistente.

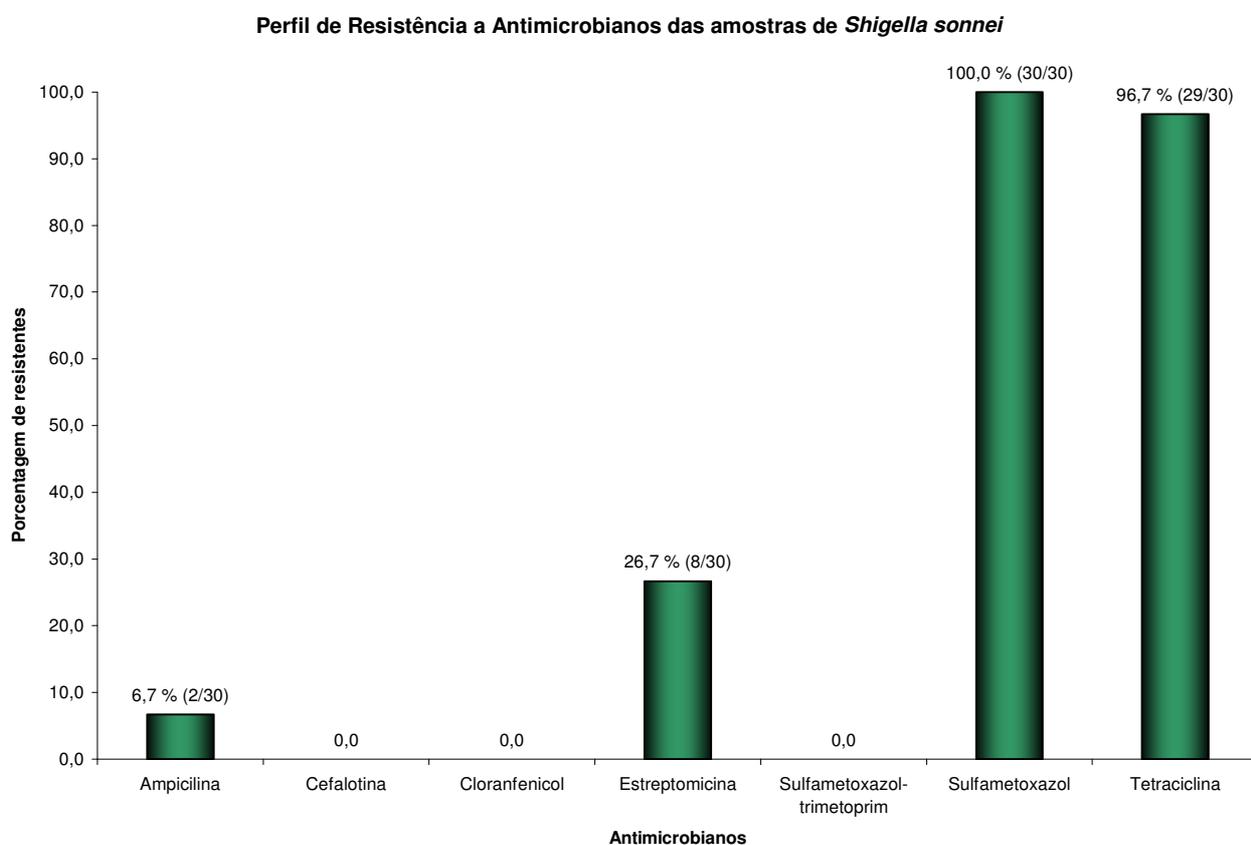


Figura 3: Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de *Shigella sonnei*

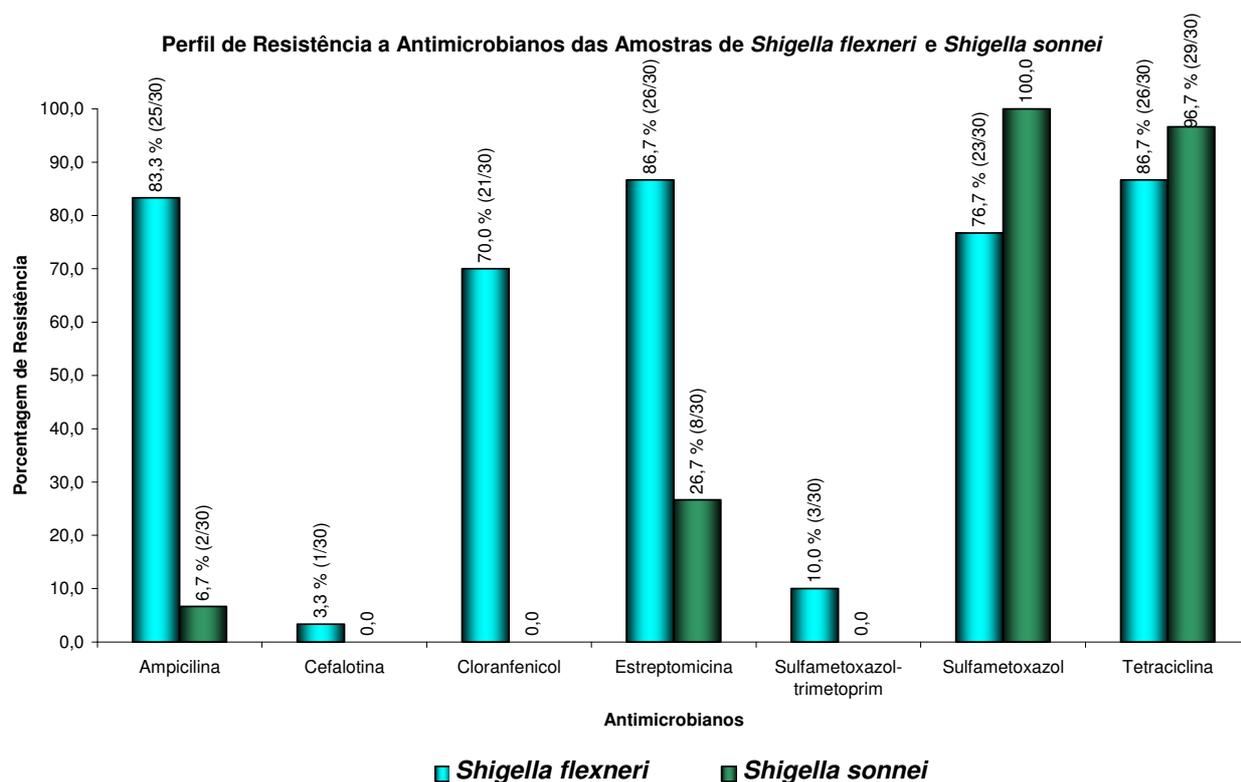


Figura 4: Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*

Os resultados mostram que 90% das amostras de *S. flexneri* (27 amostras) isoladas nos municípios de São João da Boa Vista, Jundiá, Itapira, Mogi Guaçu e Campinas evidenciaram um perfil multi-resistente, isto é, foram resistentes a no mínimo três classes de antimicrobianos distintos. Da mesma forma, 30% (9) das amostras de *S. sonnei* isoladas dos municípios anteriormente citados, têm um perfil multi-resistente.

Assim, através da análise dos resultados verificou-se que 60% das amostras (60) cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz – Campinas - SP, foram multi-resistentes e que houve uma evidência significativa de multi-resistência para as amostras de *Shigella flexneri*.

Teste de Adesão

Neste teste, 9 (30%) amostras de *Shigella sonnei* apresentaram adesão em células HEp-2 e 17 (56,6%) amostras apresentaram adesão às células HeLa, sendo que também foram observados prováveis processos de invasão, e vacuolização. (Figura 5)

Para as amostras de *Shigella flexneri*, 17 (56,6%) mostraram adesão para células HEp-2 e 18 amostras (60%) apresentaram adesão às células HeLa, os mesmos possíveis processos de invasão e vacuolização foram observados.

Os resultados estão contidos nas tabelas que seguem.

Tabela 3. Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa de amostras de *Shigella sonnei*.

Amostras	HEp-2		HeLa	
	Sem manose	Com manose	Sem Manose	Com Manose
Ss1	-	-	-	-
Ss2	-	-	+	+
Ss3	-	-	-	-
Ss4	-	-	+	+
Ss5	-	-	-	- (v)
Ss6	-	-	+ (v)	- (v)
Ss7	-	-	+	-
Ss8	-	-	+	-
Ss9	-	-	+	-
Ss10	+	-	-	-
Ss11	+(i)	+	+	+(i)
Ss12	-	-	-	-
Ss13	-	-	+(i)	+(i)
Ss14	+	-	+(i)	+(i)
Ss15	-	-	+(i)	+(i)
Ss16A	- (v)	- (v)	+(i)	+(i)
Ss16B	- (v)	- (v)	+(i)	-
Ss16C	- (v)	- (v)	+	+
Ss16D	- (v)	- (v)	- (v)	- (v)
Ss16E	+(i)	- (v)	+(i)	+(i) (v)
Ss16F	+	+(i)	+	-
Ss16G	+(v)	+(v)	-	-
Ss16H	+(v)	+(v)	-	-
Ss16I	+(v)	+	+	-
Ss17	+(v)	+(v)	-	-
Ss18	- (v)	- (v)	+	-
Ss19A	-	-	-	-
Ss19B	-	-	-	-
Ss19C	-	-	-	-
Ss20	- (v)	- (v)	-	-

Legenda: Adesão → (+); adesão negativa → (-); vacuolização → (v) invasão → (i).

Tabela 4. Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa de amostras de *Shigella flexneri*

Amostras	HEp-2		HeLa	
	Sem manose	Com manose	Sem Manose	Com Manose
Sf 1A	- (v)	- (v)	-	-
Sf 1B	- (v)	- (v)	+	-
Sf 2	-	-	+	+
Sf 3	- (v)	- (v)	-	-
Sf 4	+	-	-	-
Sf 5	- (v)	- (v)	-	-
Sf 6	+	+	+	-
Sf 7	+	-	-	-
Sf 8	+ (i)	+ (i)	+	-
Sf 9	+ (i)	+ (i)	+	-
Sf 10	- (v)	- (v)	+	-
Sf 11	-	-	-	-
Sf 12A	+ (i)	+ (i)	+	+
Sf 12B	+ (i)	+ (i)	+ (i)	+ (i)
Sf 12C	+ (v)	- (v)	+	-
Sf 12 D	+ (i) (v)	+ (i) (v)	+	+
Sf 13	- (v)	- (v)	+	-
Sf 14	+ (i) (v)	+ (i) (v)	+ (i)	-
Sf 15	-	-	+ (i)	+ (i)
Sf 16	+ (i)	+ (i)	+	+
Sf 17	-	-	+ (i)	+ (i)
Sf 18	+	-	-	-
Sf 19	+ (i)	+ (i)	+	-
Sf 20	+	+	-	-
Sf 21	-	-	+	+
Sf 22	-	-	+ (i)	+ (i)
Sf 23	+	-	-	-
Sf 24	-	-	-	-
Sf 25	+ (i)	+ (i)	-	-
Sf 26	+	+ (v)	-	-

Legenda: Adesão → (+); adesão negativa → (-); vacuolização → (v) invasão → (i).

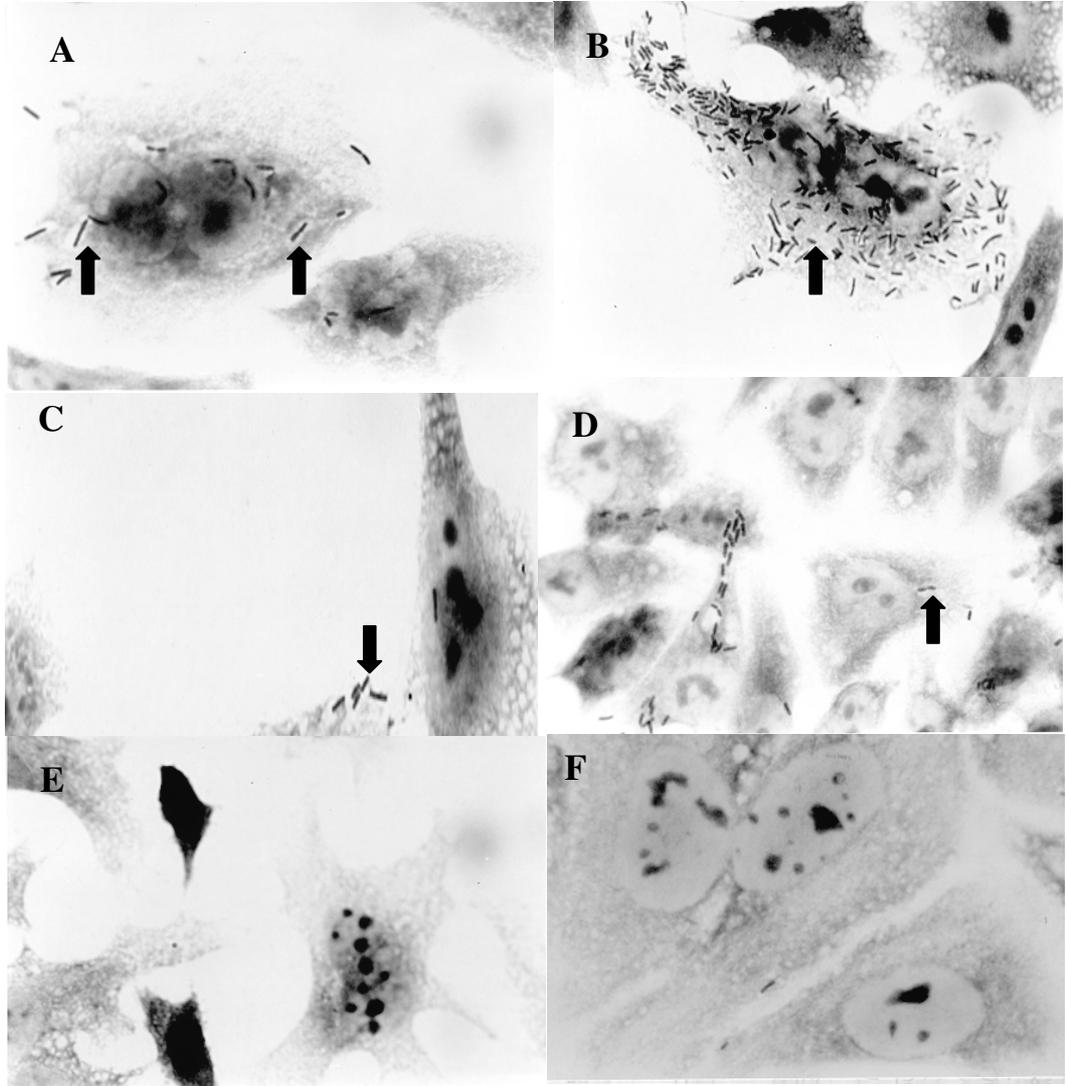


Figura 5: Fotos do teste de adesão e invasão em células HeLa e Hep-2, cultivadas *in vitro* das amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*. A: Sf 2 (HeLa – com manose); B: Sf 6 (HEp-2 – com manose); C: Ss 16 E (HeLa – com manose); D: Ss 16 G (HEp-2 com manose); E: HB101 (K12) – controle negativo (HeLa). F: HB101 (K12) controle negativo (HEp-2). Magnificação de 1000X. As setas indicam a provável invasão das bactérias.

Análise do Perfil Plasmidial

As amostras utilizadas de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* apresentaram perfis plasmidiais variáveis, sendo que algumas apresentaram plasmídios de alto peso molecular, assim como plasmídios de baixo peso molecular (figuras 6, 7, 8, 9).

Foram observadas amostras apresentando 01 a 09 plasmídios.

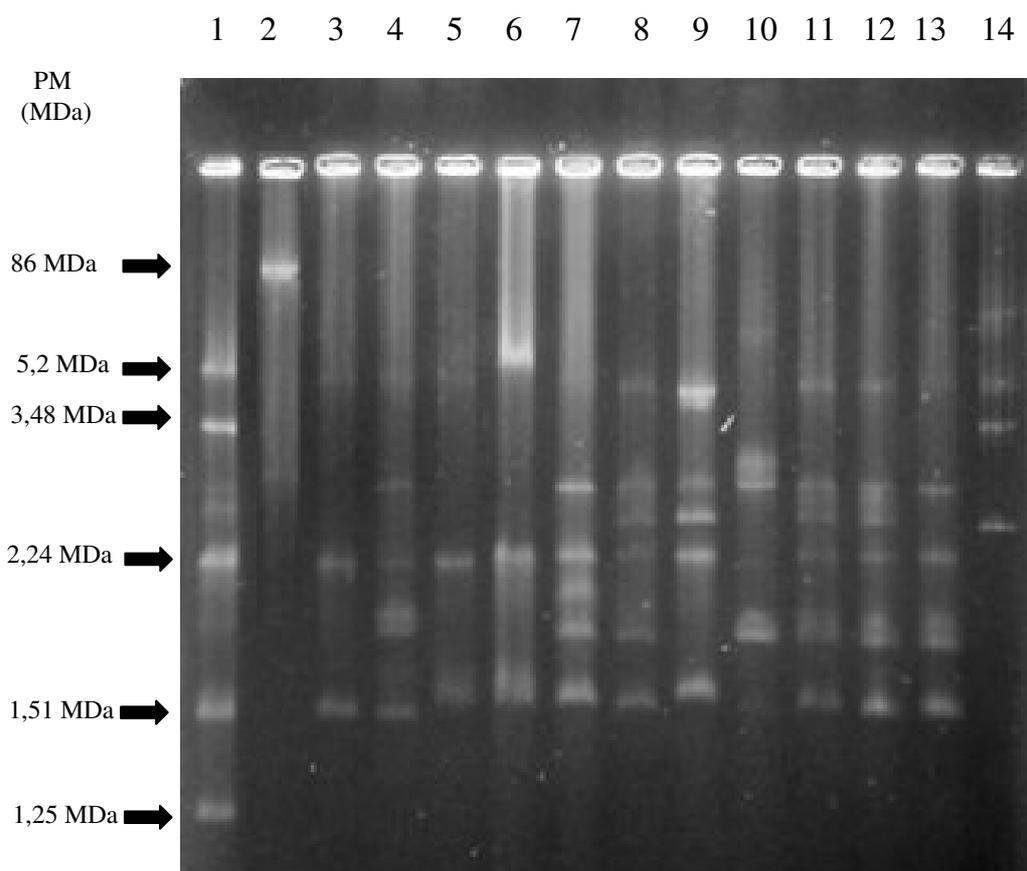


Figura 6. Gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético plasmidial de *Shigella flexneri*. 1. = Padrão – *E. coli* V517 (pesos moleculares 1,25 Md, 1,51 Md, 1,69 Md, 2,24 Md, 3,03 Md, 3,48 Md, 5,12 Md e 32 Md); 2 = Padrão de peso molecular pRA1 (86 Md); 3 = Sf 1A; 4 = Sf 1B; 5 = Sf 2 = Sf 4; 6 = Sf 3; 7 = Sf 5; 8 = Sf 7 = Sf 6; 9 = Sf 8; 10 = Sf 10 = Sf 9; 11 = Sf 11; 12 = Sf 12B = Sf 12A = Sf 12C; 13 = Sf 12D; 14 = Sf 13.

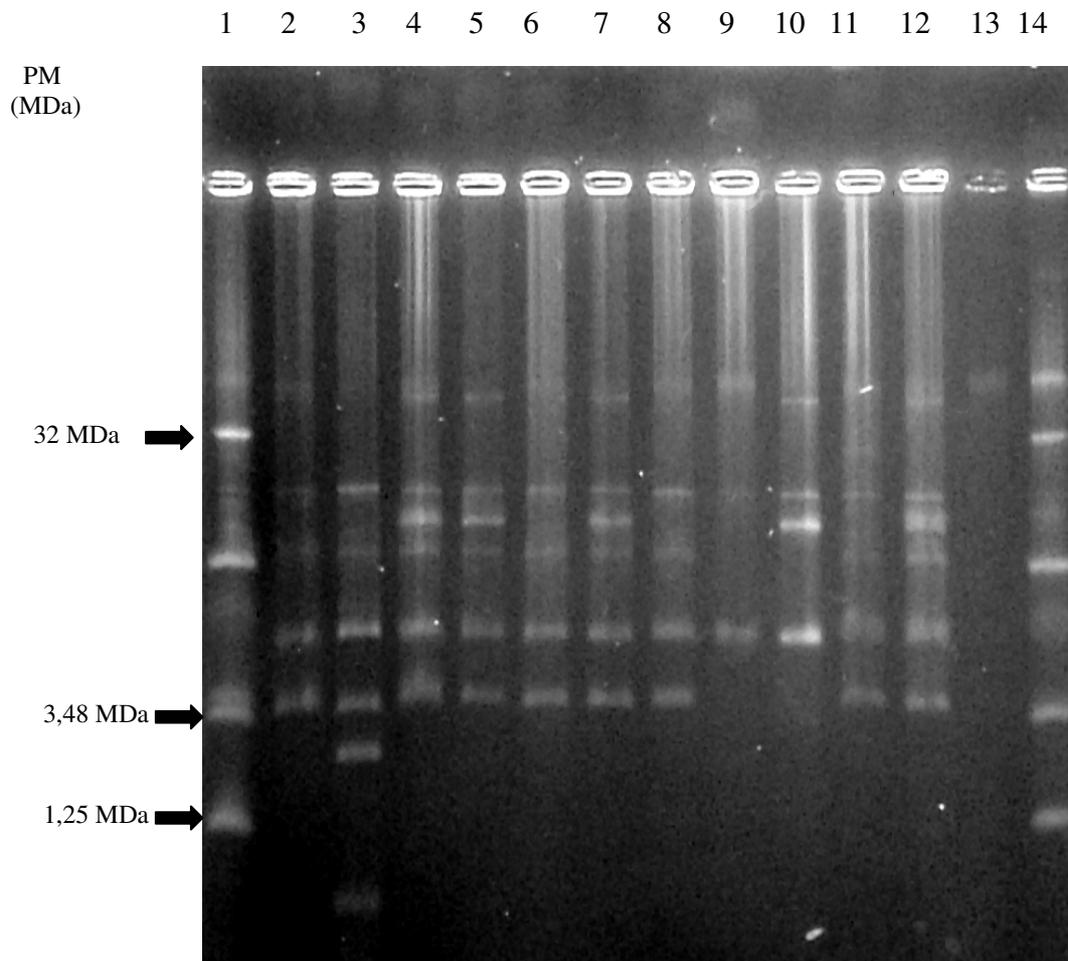


Figura. 7. Gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforéticomigração plasmidial de *Shigella flexneri*. 1. = Padrão de peso molecular – *E. coli* V517 (pesos moleculares 1,25 Md, 1,51 Md, 1,69 Md, 2,24 Md, 3,03 Md, 3,48 Md, 5,12 Md e 32 Md); 2. = Padrão de peso molecular pRA1 (86 Md); 3. = Sf 14; 4. = Sf 15; 5. = Sf 16; 6. = Sf 17; 7. = Sf 18 = Sf 25; 8. = Sf19; 9 = Sf 20; 10. = Sf 21; 11. = Sf 23 = Sf 22; 12. = Sf 24; 14. = Sf 26.

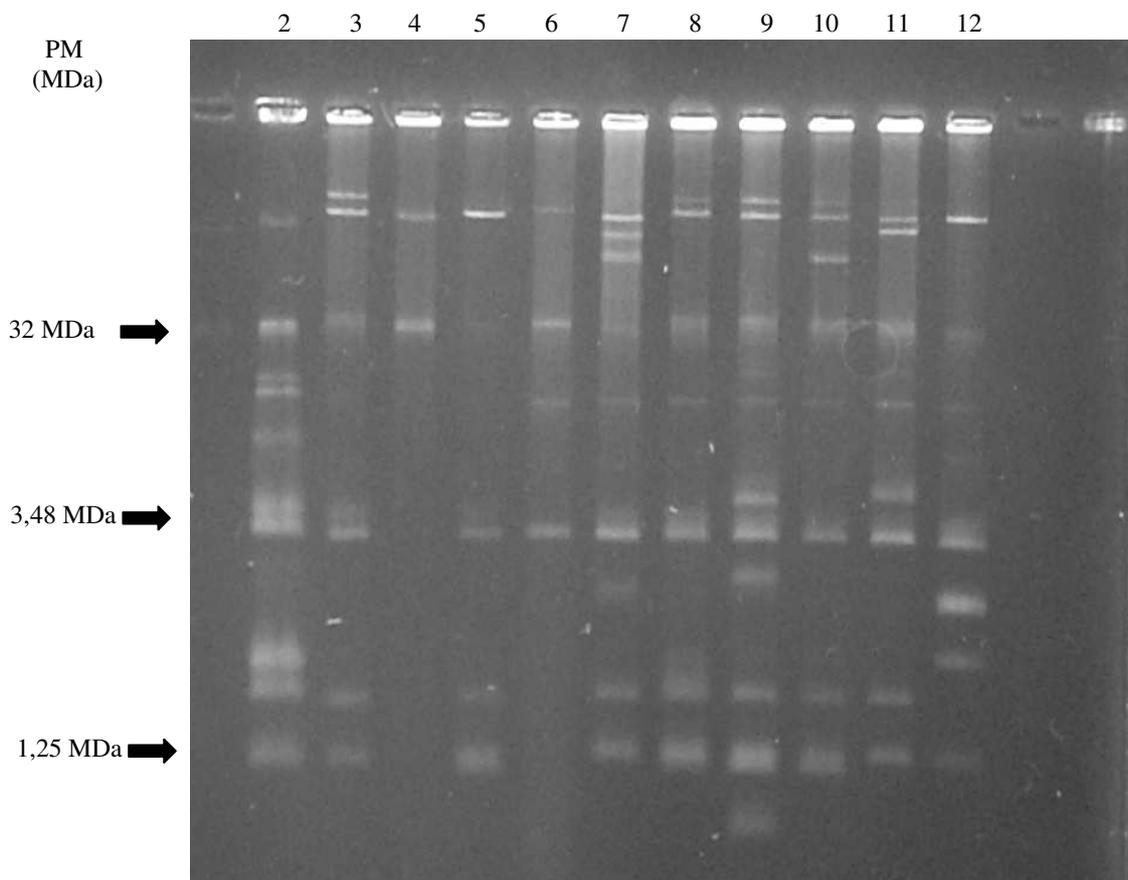


Figura 8. Gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético de migração plasmidial de amostras de *Shigella sonnei* 2. = Padrão - *E. coli* V517 (pesos moleculares 1,25 Md, 1,51 Md, 1,69 Md, 2,24 Md, 3,03 Md, 3,48 Md, 5,12 Md e 32 Md); 3 = Padrão de peso molecular pRA1 (86 Md); 4. = Ss 1; 5.= Ss 2; 6. = Ss 3; 7. = Ss 4; 8. = Ss5; 9. = Ss6; 10 = Ss7; 11. = Ss8; 12. = Ss9 = Ss10.

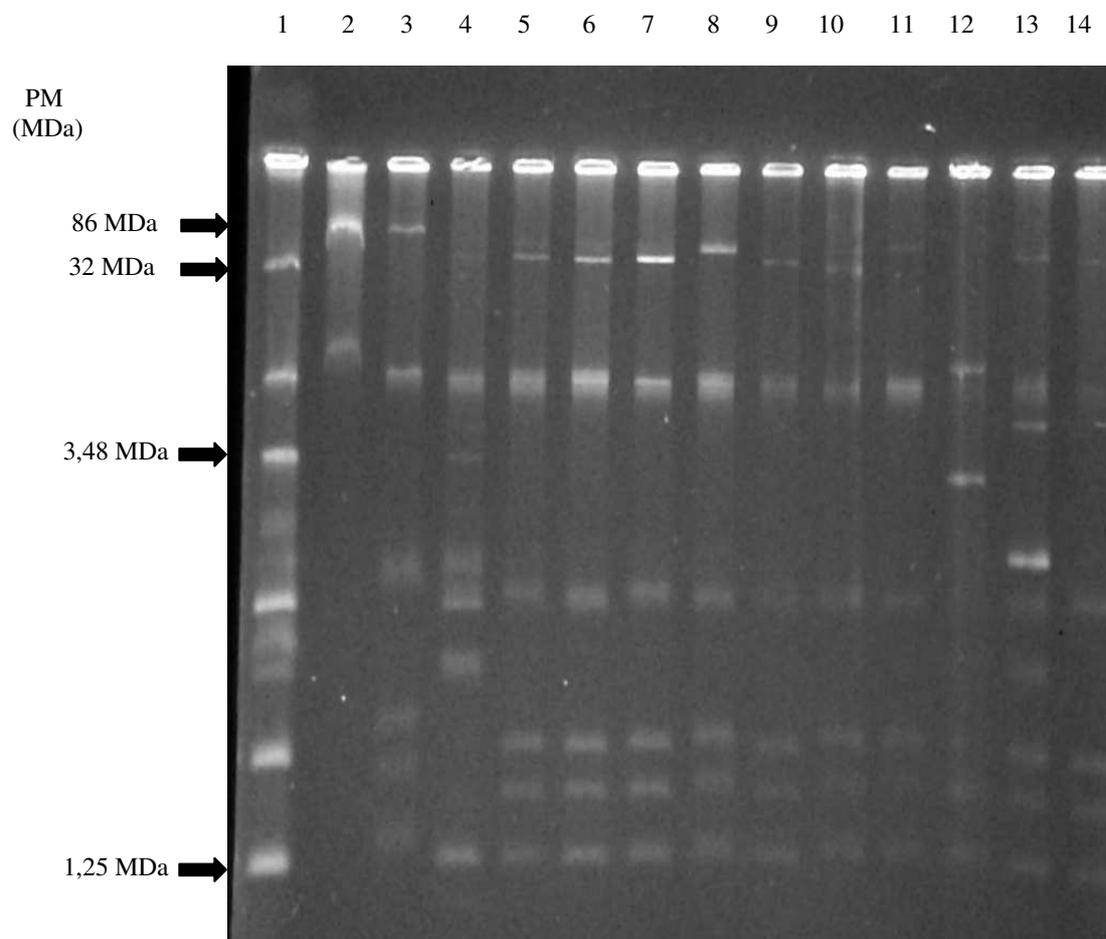


Figura 9. Gel de agarose (0,7%). Perfil eletroforético da migração plasmidial de *Shigella sonnei*. 1. = Padrão - *E. coli* V517 (pesos moleculares 1,25 Md, 1,51 Md, 1,69 Md, 2,24 Md, 3,03 Md, 3,48 Md, 5,12 Md e 32 Md); 2. = Padrão de peso molecular pRA1 (86 Md); 3. = Ss 11 = Ss 12; 4. = Ss13; 5. = Ss 15 = Ss 14; 6. = Ss 16A = Ss 16B = Ss 16C; 7. = Ss 16D; 8. = Ss 16 E; 9. = Ss 16F = Ss 16G; 10. = Ss 16H; 11. = Ss 16I; 12. = Ss 17 = Ss 18; 13. = Ss 19A = Ss 19B = Ss19C; 14. = Ss 20.

Reação de PCR

As reações de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Versalovic *et al.*, 1991) para *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* foram realizadas em duplicata e, caso diferentes, uma terceira reação foi realizada para efeitos de comparação. Géis foram construídos com amostras que apresentaram diferentes perfis (Figuras 10 e 11).

Assim, as amostras de *S. flexneri* (Sf) idênticas foram **Sf1A**= Sf1B = Sf3 = Sf4; **Sf2** = Sf5 = Sf6 = Sf7; **Sf8** = Sf11 = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf19 = Sf20 = Sf21 = Sf22 = Sf23 = Sf24 = Sf25 = Sf26; **Sf9** = Sf10 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf16 = Sf17 = Sf18, enquanto que as de *Shigella sonnei* (Ss) idênticas foram **Ss1** = Ss3 = Ss7 = Ss20; **Ss6**; **Ss17** = Ss18 = Ss19A = Ss19B = Ss19C; **Ss16A** = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F = Ss16G = Ss16H = Ss16I; **Ss2** = Ss4 = Ss5 = Ss8 = Ss9 = Ss10 = Ss11 = Ss12 = Ss13 = Ss14 = Ss15.

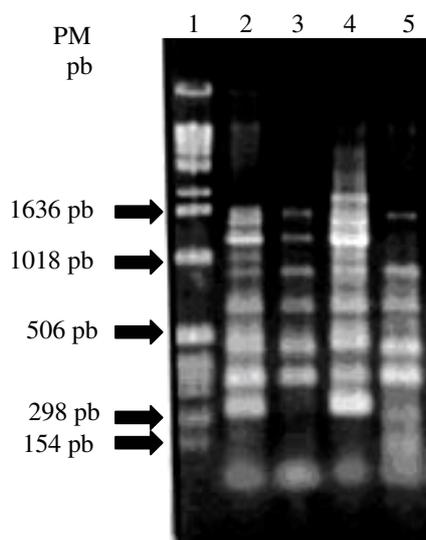


Figura 10: Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de ERIC-PCR para amostras de *Shigella flexneri*. 1. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2. Sf1A= Sf1B = Sf3 = Sf4; 3. Sf2 = Sf5 = Sf6 = Sf7; 4. Sf8 = Sf11 = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf19 = Sf20 = Sf21 = Sf22 = Sf23 = Sf24 = Sf25 = Sf26; 5. Sf9 = Sf10 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf16 = Sf17 = Sf18.

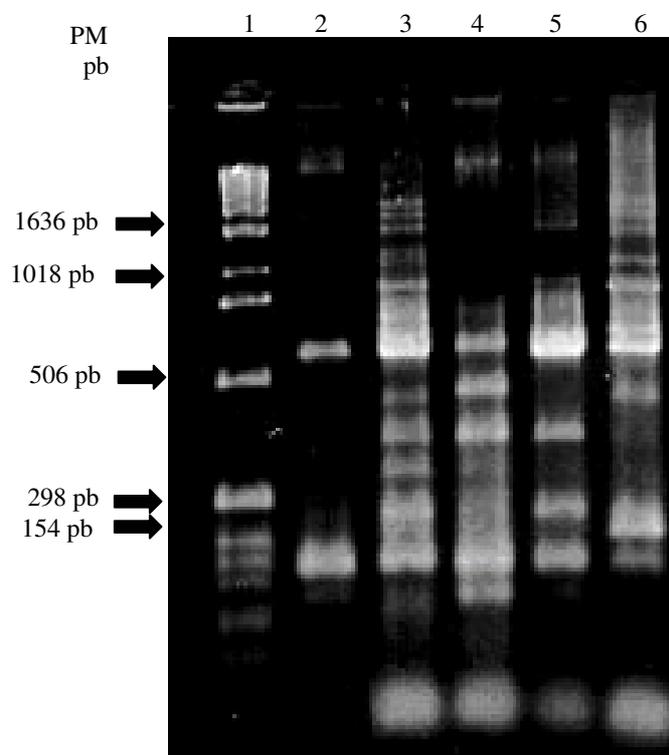


Figura 11: Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de ERIC-PCR para as amostras de *Shigella sonnei*. 1. .DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2. Ss1 = Ss3 = Ss20; 3. Ss6; 4. Ss17 = Ss18 = Ss19A = Ss19B = Ss19C; 5. Ss16A = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F = Ss16G = Ss16H = Ss16I; 6. Ss2 = Ss4 = Ss5 = Ss8 = Ss9 = Ss10 = Ss11 = Ss12 = Ss13 = Ss14 = Ss15.

A análise dos perfis eletroforéticos das seqüências ERIC amplificadas para as diferentes amostras permitiu a construção de dendrogramas de similaridade genética para as mesmas (Figuras 12 e 13)

Onde, para as amostras de *Shigella flexneri*, o dendrograma obtido é constituído por 4 ramos principais, formados por amostras que apresentam 100% de similaridade genética. O ramo 1A é composto por 9 amostras que apresentam maior distância genética em relação às amostras pertencentes aos outros ramos, possuindo apenas 22% de similaridade genética com as amostras componentes dos demais ramos. As amostras componentes dos demais ramos compartilham cerca de 35% de similaridade genética, sendo que entre estas as componentes do ramo 2A apresentam maior divergência que as amostras componentes dos ramos 3A e 3B, que compartilham cerca de 65% de similaridade genética.

As amostras do ramo 1A foram isoladas nas cidades de Campinas (Sf10, Sf16, Sf17, Sf18, Sf19) e Itapira (Sf12A, Sf12B, Sf12C, Sf12D) (SP). Todas as amostras pertencentes a estes ramos apresentaram multi-resistência a antimicrobianos. Com exceção da amostra Sf10, todas as demais apresentaram capacidade de adesão em pelo menos um dos tipos celulares testados. Além de adesão positiva, as amostras Sf12A, Sf12B, Sf12C, Sf12D, Sf16 e Sf19, apresentaram capacidade de invasão em células HEp-2.

O ramo 2A é constituído por 4 amostras que apresentaram 100% de similaridade. Duas destas amostras são provenientes de São João da Boa Vista – SP (Sf1A e Sf1B), uma é originária de Campinas – SP (Sf4) e outra originária de Jundiaí (Sf3). Com exceção da amostra Sf4 (que apresentou adesão manose sensível em células HEp-2) e da Sf1B, nenhuma das amostras pertencentes a este ramo apresentou capacidade de adesão aos tipos celulares testados.

Todas as amostras componentes do ramo 3A foram isoladas na cidade de Campinas (SP) e caracterizam-se por apresentar multi-resistência a antimicrobianos. A capacidade de adesão às células cultivadas *in vitro* neste grupo é bastante variável. A amostra Sf2 apresentou adesão manose resistente às células HeLa; Sf5 não apresentou capacidade de adesão aos dois tipos celulares testados (HeLa e HEp-2), mas exibe vacuolização em células HEp-2; a amostra Sf6, apresentou capacidade de adesão nas culturas de HEp-2 e HeLa e a amostra Sf7 apresentou capacidade de adesão manose sensível em células HEp-2.

O ramo 3B é formado por 13 amostras originárias de Campinas (SP). Com exceção das amostras Sf25 e Sf24, todas apresentaram multi-resistência a antimicrobianos. Entre as amostras componentes deste ramo, duas (Sf11 e Sf24) não apresentaram capacidade de adesão aos dois tipos celulares testados; as amostras Sf25, Sf15, Sf19, Sf22 e Sf14 exibiram capacidade de invasão em pelo

menos um dos tipos celulares testados e as amostras Sf8, Sf26, Sf20, Sf23, Sf13 e Sf21 apresentaram adesão positiva.

A figura 13 mostra o dendrograma obtido através da análise das seqüências ERIC amplificadas nas amostras de *S. sonnei*. O dendrograma desta população é composto por 5 ramos (denominados 1, 2, 3, 4A e 4B).

Cinco amostras foram agrupadas no ramo 1, que se caracteriza por apresentar 22% de similaridade genética com as amostras componentes dos demais ramos. Duas amostras (Ss17 e Ss18) componentes deste ramo foram isoladas em Campinas (SP) e três (Ss19A, Ss19B e Ss19C) da cidade de Vinhedo (SP). Todas estas amostras apresentaram resistência para dois antimicrobianos e duas amostras apresentaram capacidade de adesão: a Ss17 exibiu adesão manose resistente às células HEp-2 e a amostra Ss18 mostrou adesão manose sensível à células HeLa.

O ramo 2 é composto por 4 amostras onde 2 foram isoladas em Campinas (Ss7 e Ss20) (SP), uma (Ss1) de Mogi Guaçu (SP) e uma (Ss3) de Limeira. Com exceção da amostra Ss7, que apresentou adesão manose sensível às células HeLa, todas as demais não exibiram capacidade de adesão às células testadas.

O ramo 3 é formado por 11 amostras, sendo 9 (Ss4, Ss5, Ss8, Ss10, Ss11, Ss12, Ss13, Ss14, Ss15) isoladas em Campinas, uma (Ss2) em Bragança Paulista e outra em Cosmópolis (Ss9). As amostras Ss13, Ss14, Ss15 apresentaram o mesmo perfil de resistência (Tetraciclina e Sulfametoxazol resistentes) e também, capacidade adesão manose resistente e invasão às células HeLa. A amostra Ss11 também apresentou o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos e também apresentou capacidade de adesão manose resistente aos dois tipos celulares testados. As amostras Ss12 e Ss5, multi-resistentes, não apresentaram capacidade de adesão. As demais amostras apresentaram capacidade de adesão a pelo menos um dos tipos celulares testados.

O ramo 4A é formado pela amostra Ss6, isolada em Campinas, e que apresentou capacidade de adesão manose resistente às células HEp-2 e manose sensível às células HeLa.

O ramo 4B é composto por 9 amostras (Ss16A, Ss16B, Ss16C, Ss16D, Ss16E, Ss16F, Ss16G, Ss16H, Ss16I) isoladas em Campinas mostram-se resistentes a Tetraciclina e a Sulfametoxazol. Com exceção da amostra Ss16D, todas as outras amostras apresentaram capacidade de adesão a pelo menos um dos tipos celulares testados. As amostras Ss16A, Ss16B e Ss16E também apresentaram capacidade de invasão às células HeLa e Ss16F exibiu invasão às células HEp-2.

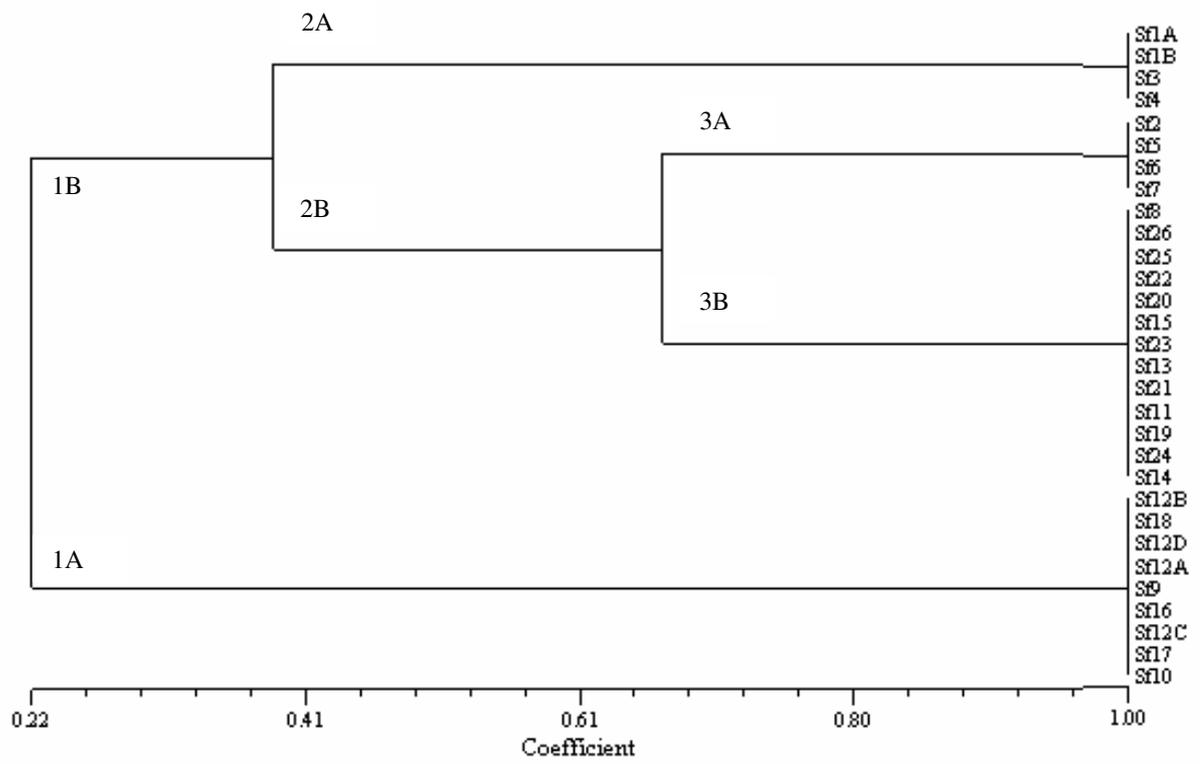


Figura 12 – Dendrograma de Similaridade para as amostras de *Shigella flexneri* para a metodologia ERIC-PCR

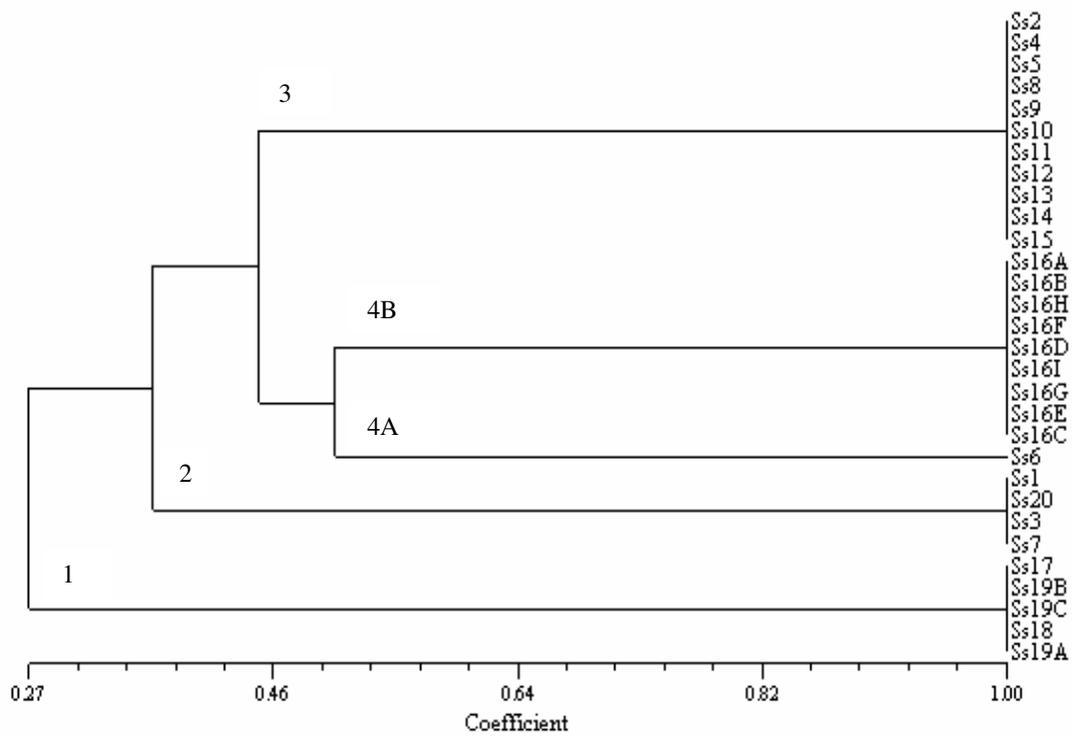
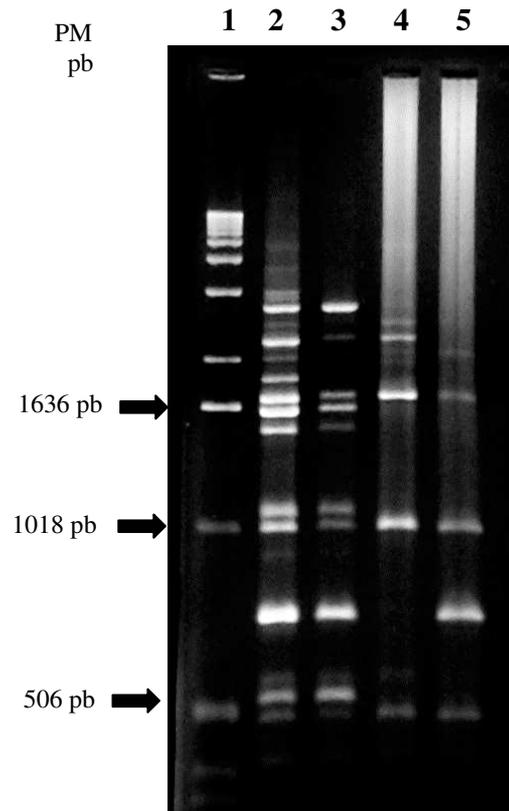


Figura 13 – Dendrograma de similaridade para as amostras de *Shigella sonnei* para a metodologia ERIC-PCR

As reações de REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic – Versalovic *et al.*, 1991) para *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* foram realizadas em duplicata e, caso diferentes, uma terceira reação foi realizada para efeitos de comparação. Géis foram realizados com amostras que apresentaram diferentes perfis de (Figuras 14 e 15).

Assim as amostras de *Shigella flexneri* (Sf) idênticas foram **Sf1A** = Sf1B = Sf5 = Sf9; **Sf2** = Sf3 = Sf4 = Sf6 = Sf7 = Sf8 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf19 = Sf26; **Sf11** = Sf20 = Sf24; **Sf10** = Sf16 = Sf17 = Sf18 = Sf 21 = Sf 22 = Sf 23 = Sf25, enquanto que as de *Shigella sonnei* (Ss) idênticas foram **Ss1** = Ss2 = Ss3 = Ss4, **Ss5** = Ss6 = Ss7 = Ss8 = Ss9 = Ss10 = Ss11 = Ss12 = Ss16A = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F = Ss16G = Ss16H = Ss16I = Ss17 = Ss18 = Ss20; **Ss13** = Ss14 = Ss15 = Ss19A = Ss19B = Ss19C.



**Figura 14. Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de REP-PCR para amostras de *Shigella flexneri*.
 1. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2. Sf1A= Sf1B = Sf5 = Sf9; 3. Sf2 = Sf3 = Sf4 = Sf6 = Sf7 = Sf8 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf19 = Sf26; 4. Sf11 = Sf20 = Sf24; 5. Sf10 = Sf16 = Sf17 = Sf18 = Sf 21 = Sf 22 = Sf 23 = Sf25.**

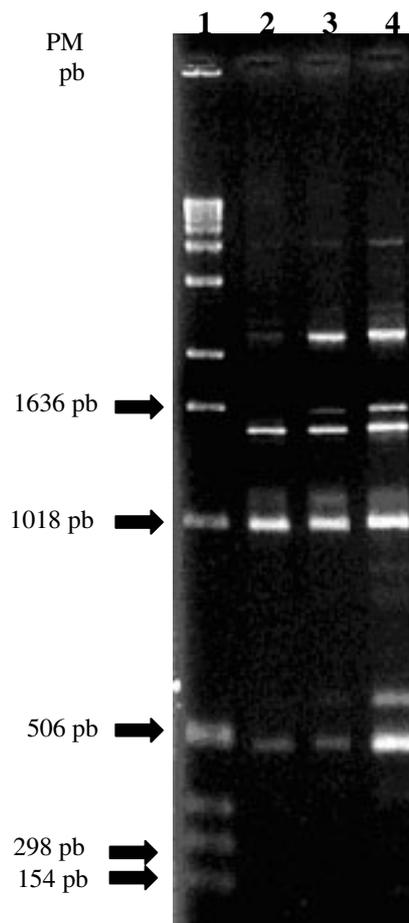


Figura 15. Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de REP-PCR para as amostras de *Shigella sonnei*. 1. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL.; 2. Ss1 = Ss2 = Ss3 = Ss4; 3 Ss5 = Ss6 = Ss7 = Ss8 = Ss9 = Ss10 = Ss11 = Ss12 = Ss16A = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F = Ss16G = Ss16H = Ss16I = Ss17 = Ss18 = Ss20; 4. Ss13 = Ss14 = Ss15 = Ss19A = Ss19B = Ss19C

A análise dos perfis eletroforéticos resultantes da amplificação das seqüências REP permitiu a construção de dendrogramas de similaridade genética entre as amostras. Os dendrogramas obtidos estão demonstrados nas figuras seguintes (Figura 16 e 17).

A figura 16 representa o dendrograma obtido a partir da amplificação da seqüências REP das amostras de *S. flexneri*. O dendrograma apresenta 4 ramos denominados 1A, 1B, 2A e 2B.

O ramo 1A é composto por três amostras isoladas de Campinas (SP). A amostra Sf20 apresentou capacidade de adesão manose resistente em células HEp-2, as amostras Sf11 e Sf24 não apresentaram capacidade de adesão. Todas apresentam resistência a pelo menos 2 antimicrobianos testados.

O ramo 1B é composto por 8 amostras multi-resistentes a antimicrobianos. Com exceção da amostra Sf25, isolada em Mogi Guaçu (SP), todas as demais amostras agrupadas no ramo 1B são originárias de Campinas (SP). Todas as amostras desse grupo apresentam capacidade de adesão a pelo menos um dos tipos celulares e, as amostras Sf16, Sf17, Sf22 e Sf23 mostraram capacidade de invadir as células testadas.

Quinze amostras foram agrupadas no ramo 2A. Quatorze amostras apresentam capacidade de adesão a pelo menos um dos tipos celulares testados e as amostras Sf12A, Sf12B, Sf12C, Sf12D, isoladas na cidade de Itapira (SP), apresentaram capacidade de invasão. A amostra Sf3, isolada em São João da Boa Vista (SP), não apresentou capacidade de adesão. As demais amostras são originárias de Campinas (SP).

O ramo 2B é formado por 4 amostras (Sf1A, Sf1B, Sf5 e Sf9) multi-resistentes aos antimicrobianos testados. Apenas a amostra Sf9 apresentou capacidade de adesão. As amostras Sf1A e Sf1B são provenientes de São João da Boa Vista (SP) e as amostras Sf5 e Sf9 são originárias de Campinas (SP).

O dendrograma obtido a partir da amplificação das seqüências REP das amostras de *Shigella sonnei* está representado na figura 17. O dendrograma apresenta 3 ramos: 1, 2A e 2B, sendo que as amostras do ramo 1, compartilham 50% de similaridade genética com as amostras dos demais ramos. As amostras dos ramos 2A e 2B apresentam 90% de similaridade genética entre si.

O ramo 1 é composto por 6 amostras que apresentaram resistência a 2 antimicrobianos testados. As amostras Ss13C, Ss14, Ss15, isoladas em Campinas (SP), apresentaram capacidade de invasão à células HeLa. As amostras Ss19A, Ss19B, Ss19C, isoladas em Vinhedo (SP), não apresentaram capacidade de adesão.

O ramo 2 é formado por 19 amostras. Com exceção da amostra Ss9, isolada em Cosmópolis (SP), todas as amostras são originárias de Campinas (SP). As amostras Ss5, Ss20, Ss12 e Ss19, não apresentaram capacidade de adesão à células HEp-2 e HeLa. Por outro lado, as amostras Ss16E,

Ss16A, Ss11, Ss16B e Ss16D apresentaram capacidade de adesão. As demais amostras agrupadas no ramo 2A apresentam capacidade de adesão a pelo menos um dos tipos celulares testados.

Quatro amostras foram agrupadas no ramo 2B. Cada amostra foi isolada em uma cidade específica. Ss1 originária de Mogi Guaçu (SP), não apresentou capacidade de adesão; Ss2 proveniente de Bragança Paulista (SP), apresentou capacidade de adesão manose resistente às células HeLa ; Ss3, isolada em Limeira (SP) não demonstrou capacidade de adesão e Ss4, isolada em Campinas (SP), apresentou capacidade de adesão à células HeLa. Todas as amostras do ramo 2B são multi-resistentes aos antimicrobianos testados.

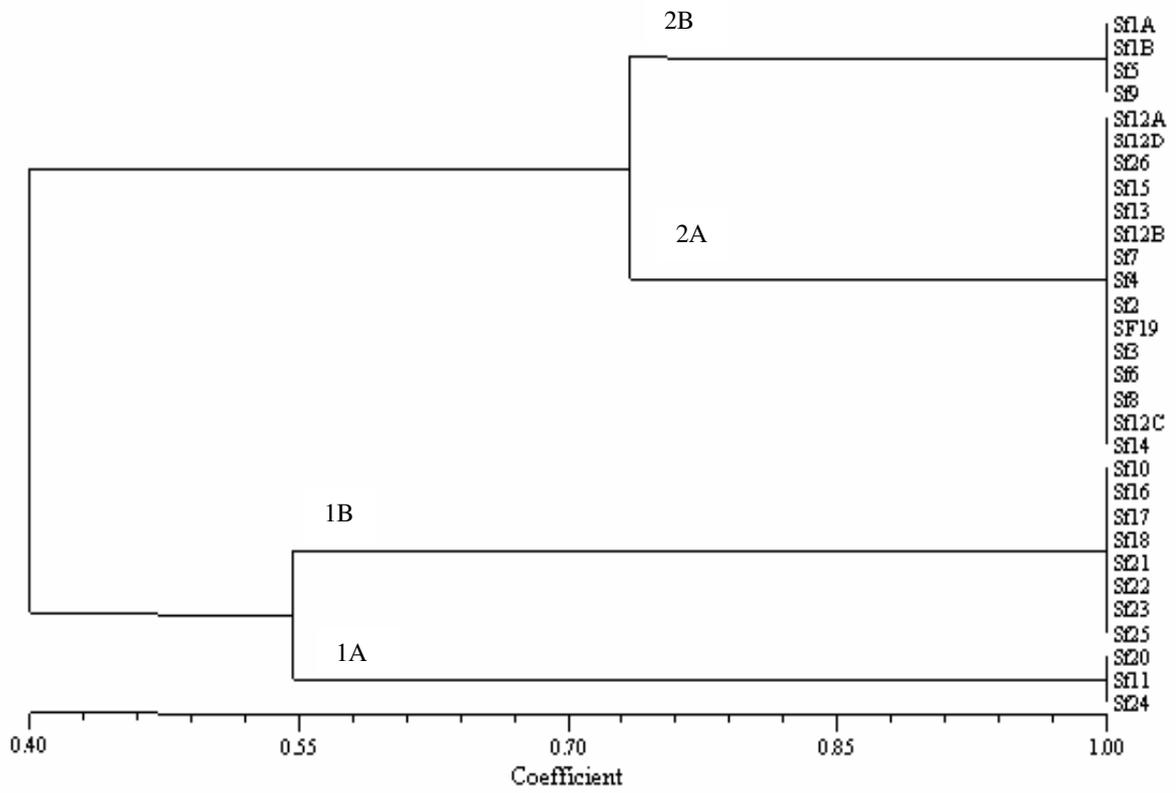


Figura 16 – Dendrograma de similaridade para as amostras de *Shigella flexneri* para a metodologia REP-PCR .

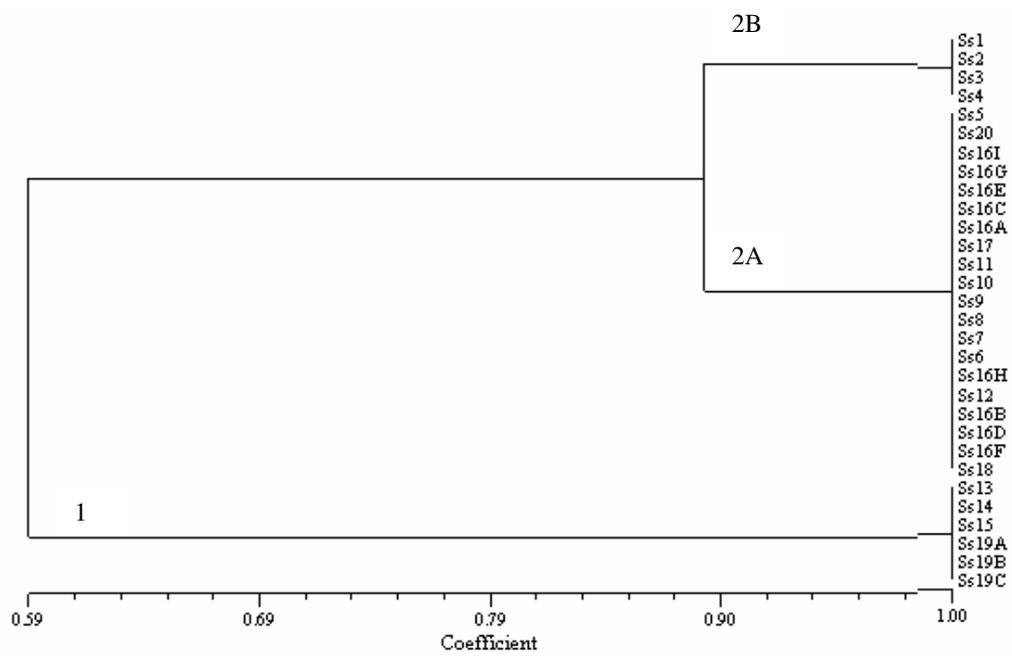


Figura 17: Dendrograma de similaridade para as amostras de *Shigella sonnei* para a metodologia REP-PCR.

As reações de DRE-PCR (Double-Repetitive-Element PCR Method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates – Riley *et al*, 1995.) para *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, mostraram amostras com perfis similares, sendo estas eliminadas e executando-se um gel definitivo (Fig. 18 e Fig. 19) com as amostras com perfis diferentes, onde, tomou-se as primeiras amostras para servirem como representantes dos grupos similares:

Assim, para *Shigella flexneri* (Sf) as amostras idênticas entre si foram **Sf1A**= Sf1B = Sf2 = Sf4 = Sf5 = Sf6 = Sf7 = Sf8 = Sf9 = Sf10 = Sf11 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf16 = Sf17 = Sf18 = Sf19 = Sf20 = Sf21 = Sf22 = Sf23 = Sf24 = Sf25 = Sf26; **Sf3**, enquanto que para *Shigella sonnei* (Ss) foram **Ss1** = Ss2 = Ss3 = Ss4 = Ss5 = Ss6 = Ss7= Ss8= Ss9= Ss10= Ss11= Ss12 = Ss14 = Ss15 = Ss16A = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F= Ss16G= Ss16H = Ss16I = Ss17 = Ss18 = Ss19A = Ss19B = Ss19C = Ss20; **Ss13**.

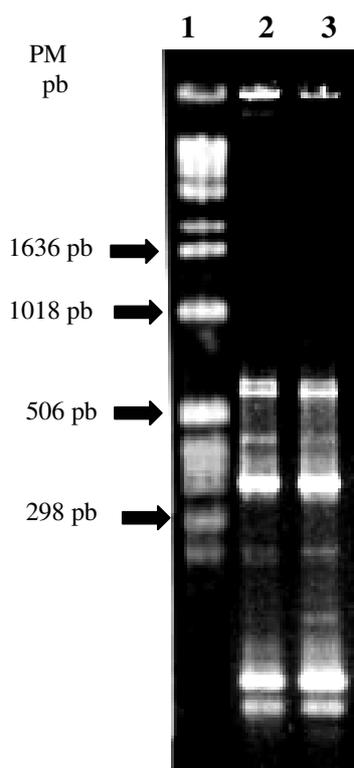


Figura 18. Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de DRE-PCR para amostras de *Shigella flexneri*. 1. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2. Sf1A= Sf1B = Sf2 = Sf4 = Sf5 = Sf6 = Sf7 = Sf8 = Sf9. = Sf10 = Sf11 = Sf12A = Sf12B = Sf12C = Sf12D = Sf13 = Sf14 = Sf15 = Sf16 = Sf17 = Sf18 = Sf19 = Sf20 = Sf 21 = Sf 22 = Sf 23 = Sf24 = Sf25 = Sf26; 3. Sf3.

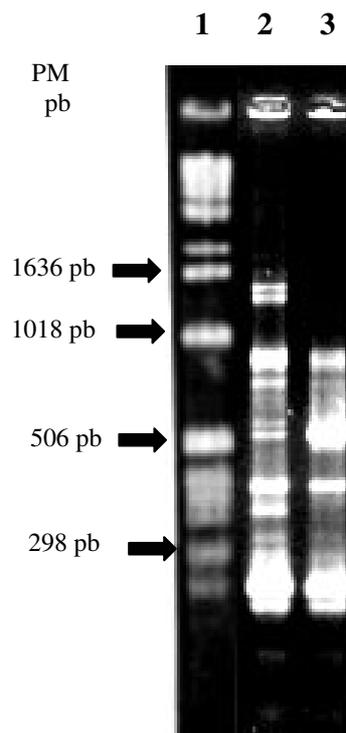


Figura 19. Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético da reação de DRE-PCR para amostras de *Shigella sonnei*. 1. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2. Ss1 = Ss2 = Ss3 = Ss4 = Ss5 = Ss6 = Ss7 = Ss8 = Ss9 = Ss10 = Ss11 = Ss12 = Ss14 = Ss15 = Ss16A = Ss16B = Ss16C = Ss16D = Ss16E = Ss16F = Ss16G = Ss16H = Ss16I = Ss17 = Ss18 = Ss19A = Ss19B = Ss19C = Ss20; 3. Ss13

A análise dos diferentes perfis obtidos para estas reações de PCR levou à construção de dendrogramas de similaridade genética entre as amostras *S. flexneri* e *S. sonnei* (Figuras 20 e 21). Em ambas as populações analisadas foram observados 2 grupos de amostras: um com uma amostra e outro com 29 amostras. As amostras de *S. flexneri* compartilharam 93% de similaridade genética em relação à seqüência DRE. As amostras de *S. sonnei* exibem 92% de similaridade genética em relação às mesmas seqüências.

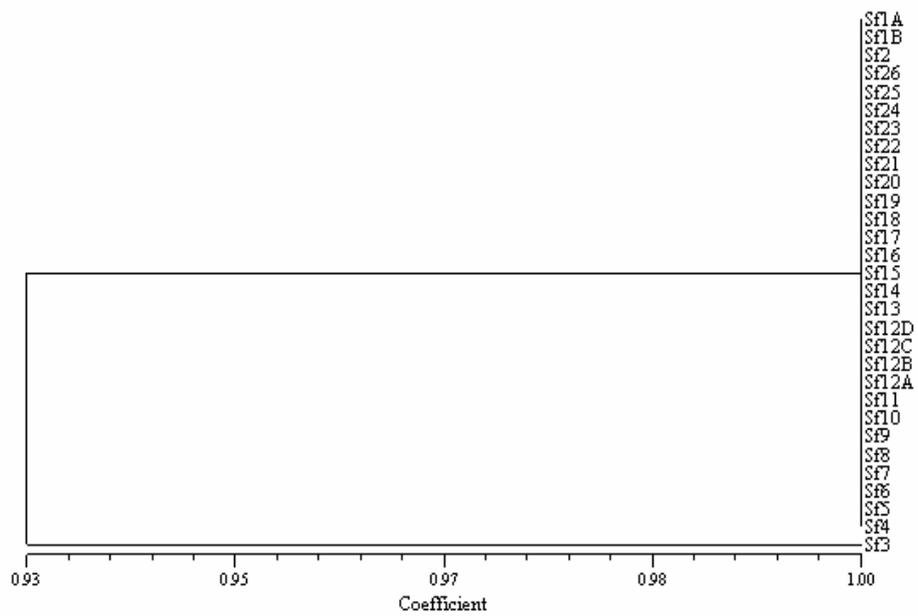


Figura 20 – Dendrograma de similaridade para as amostras de *Shigella flexneri* para a metodologia DRE-PCR.

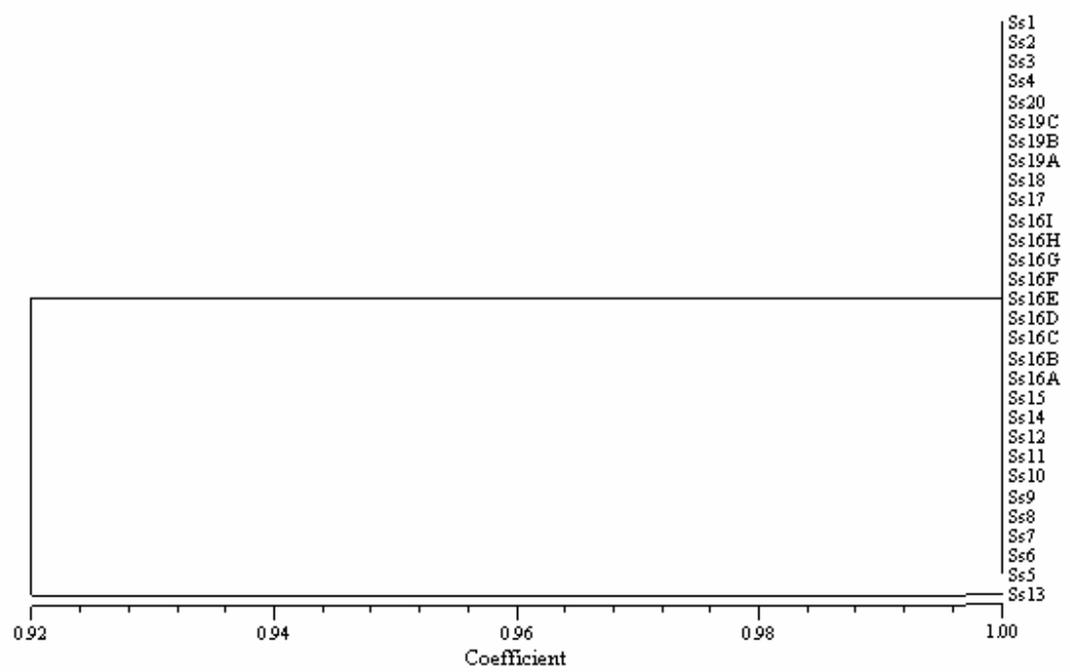


Figura 21 – Dendrograma de similaridade para as amostras de *Shigella sonnei* para a metodologia DRE-PCR.

Como as análises isoladas pelas diferentes técnicas poderiam apresentar uma possível incoerência quanto à similaridade genética, todas as amostras foram analisadas por todas as técnicas em conjunto (Figura 22).

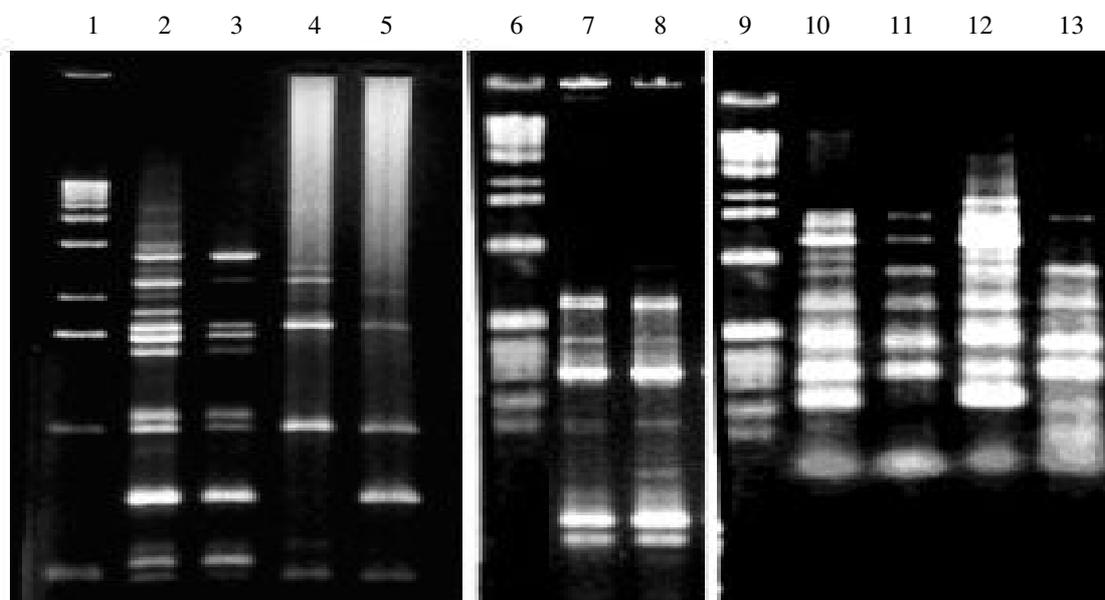


Figura 22. Gel de agarose (1,5%). Perfil eletroforético das reações de REP, DRE e ERIC-PCR respectivamente para amostras de *Shigella flexneri* para execução do dendrograma consenso. 1, 6 e 9. DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2, Sf1A; 3, Sf12A; 4, Sf10; 5, Sf20; 7, Sf1A; 8, Sf3; 10, Sf1A; 11, Sf2; 12, Sf8; 13, Sf12A.

Os resultados obtidos pela análise das reações em conjunto (REP, DRE e ERIC-PCR) levaram à construção de uma dendrograma consenso tanto para *S. flexneri* quanto para *S. sonnei* (Figuras 23 e 25).

O dendrograma consenso das amostras de *S. flexneri* (figura 23) é formado por três grupos principais: A, B e C.

O grupo C é formado por amostras que compartilham 81% de similaridade genética e é composto por 2 ramos 1A e 1B. Todas as amostras pertencentes a este grupo são originárias de Campinas (SP) e demonstraram multi-resistência aos antimicrobianos empregados no teste de sensibilidade a antimicrobianos.

Amostras pertencentes ao grupo B apresentaram cerca de 76% de similaridade genética e estão agrupadas em 3 ramos: 2A, 2B e 2C são formados por amostras isoladas em Campinas (SP), o ramo 2B, por outro lado, é composto por amostras originárias de Itapira (SP). Todas as amostras pertencentes a este grupo demonstraram se multi-resistentes.

O grupo A é formado por amostras que compartilham 81% de similaridade genética e é composto pelos ramos 3A, 3B, 3C, 4A e 4B e são formados por amostras isoladas da cidade de Campinas (SP). Amostras de São João da Boa Vista agruparam-se no ramo 4B. O ramo 3A, por outro lado, é composto por uma amostra isolada em Jundiaí (Sf3) e outra em Campinas (Sf4).

O dendrograma consenso obtido através da análise das seqüências ERIC, DRE e REP de *Shigella sonnei* está representado na figura 25 e é formado por três grupos principais: A, B e C

O grupo C é formado por amostras que compartilham cerca de 90% de similaridade que estão agrupadas em 2 ramos (IA e IB). Todas as amostras agrupadas (Ss19A, Ss19B, Ss19C) no ramo IA são originárias de Vinhedo (SP) e apresentam o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos. No ramo IB estão agrupadas 2 amostras isoladas de Campinas (Ss17 e Ss18) que também apresentam o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos.

Amostras pertencentes ao grupo B apresentam cerca de 84% de similaridade genética e estão sub-agrupadas em 4 ramos: IIA, IIB, IIC e 3. As amostras agrupadas nos ramos 2A e 3 são originárias de Campinas (SP), sendo que as do ramo 3

apresentam o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos. No ramo 2B estão uma amostra isolada em Mogi Guaçu (Ss7) e outra isolada em Campinas (Ss20).

O grupo A é formado por amostras que exibem cerca de 93% de similaridade e estão sub-agrupadas em IVA, IVB, IVC e IVD. O ramo IVA é composto por duas amostras (Ss14 e Ss15) isoladas em Campinas que apresentam o mesmo perfil de resistência antimicrobiana. O ramo IVB é formado pela amostra Ss13, que também foi isolada em Campinas e apresenta o mesmo perfil de resistência de Ss14 e Ss15. Cinco amostras (Ss5, Ss8, Ss10, Ss11, Ss12) isoladas em Campinas e uma (Ss9) isolada em Cosmópolis compõem o ramo IVC. O ramo IVD é formado por uma amostra originária de Bragança Paulista (Ss2) e outra de Campinas (Ss4). Amostras componentes dos ramos IVC e IVD apresentam o perfil de resistência antimicrobiana variável.

Shigella flexneri - REP/DRE/ERIC-PCR

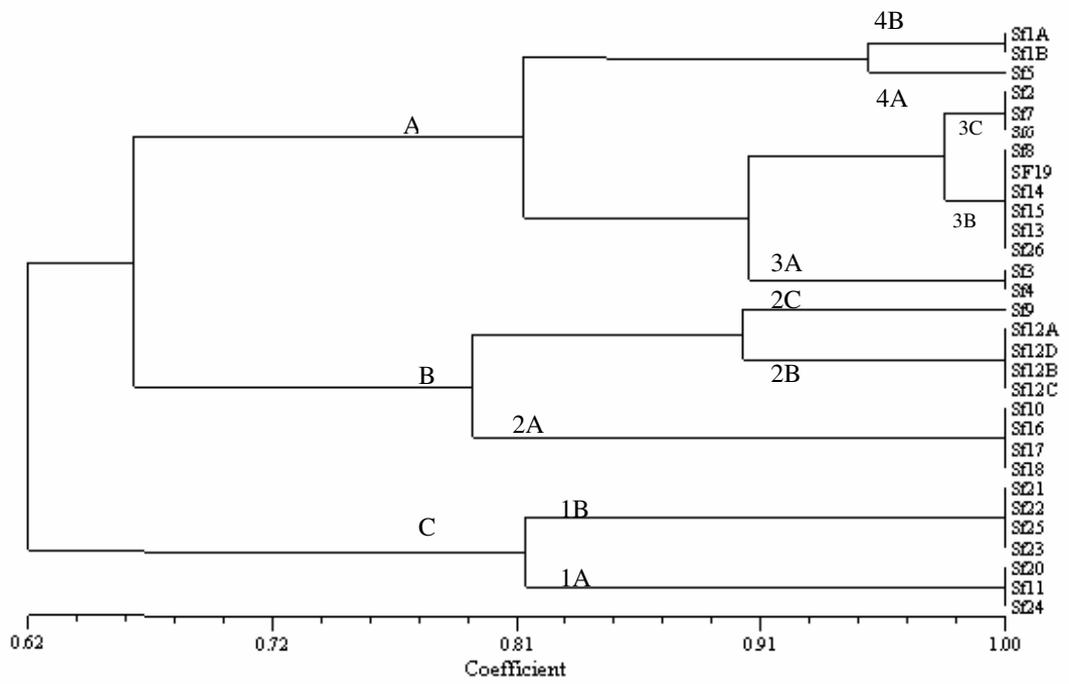


Figura 23: Dendrograma de similaridade consenso para as amostras de *Shigella flexneri* para as metodologias REP, DRE e ERIC PCR.

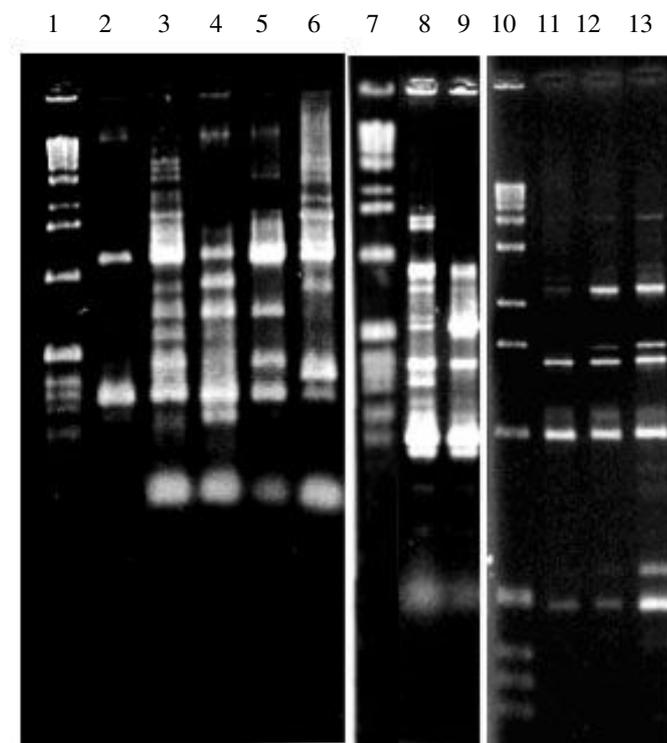


Figura 24. Gel de agarose (1,5%) Perfil eletroforético das reações de ERIC, DRE e REP-PCR para amostras de *Shigella sonnei* para execução do dendrograma consenso. 1, 7 e 10 DNA ladder 1 KB – Gibco – BRL; 2, Ss3; 3,Ss6; 4,Ss17; 5, Ss16A; 6, Ss2; 8, Ss1; 9, Ss13; 11, Ss1; 12, Ss5; 13, Ss13.

Shigella sonnei - ERIC/DRE/REP

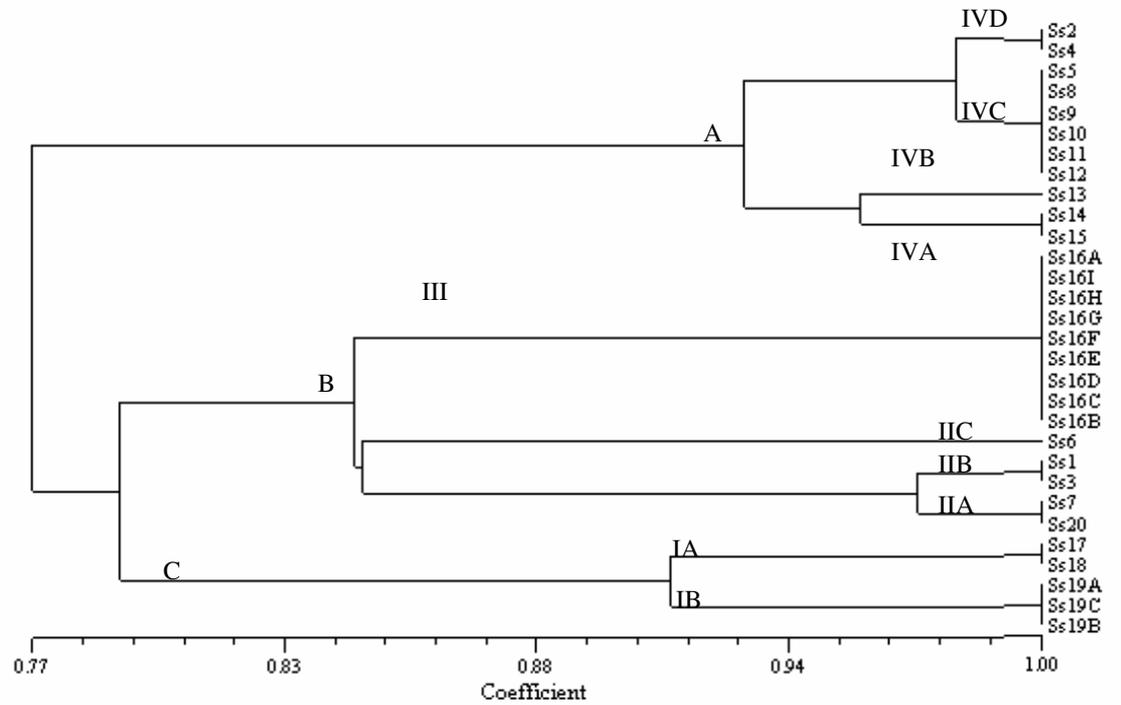
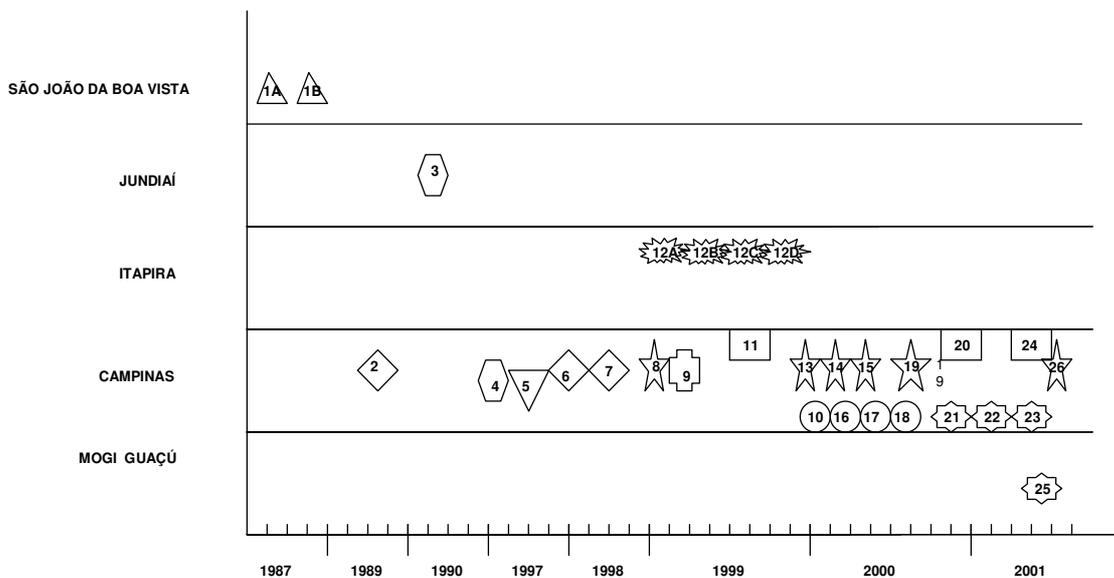


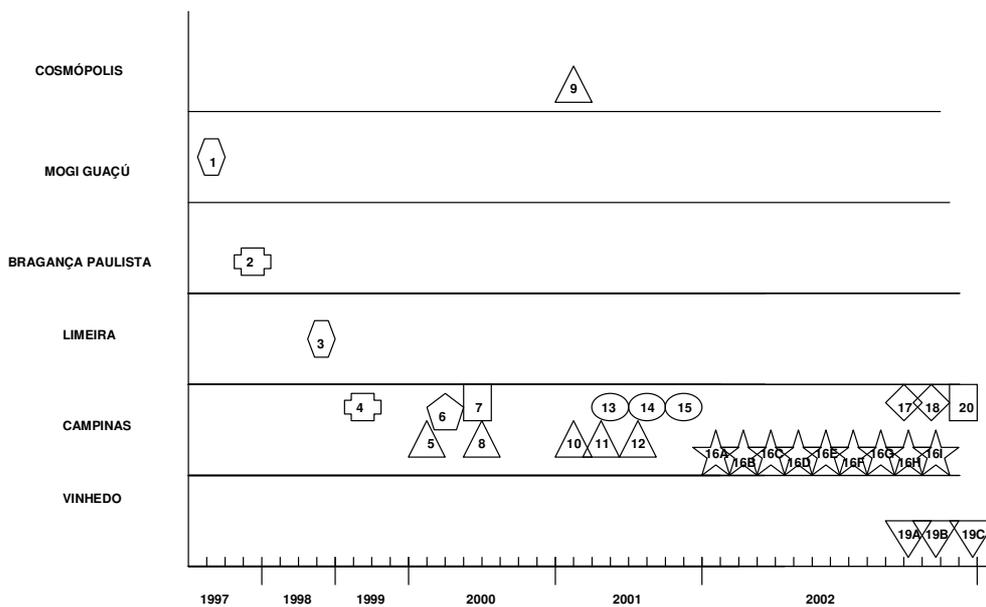
Figura 25: Dendrograma de similaridade consenso para as amostras de *Shigella sonnei* para as metodologias ERIC, DRE e ERIC PCR.

A distribuição das amostras das duas espécies ao longo do tempo de isolamento, nas diferentes cidades, permitiu verificar a ocorrência de linhagens idênticas de *Shigella* spp em diferentes localidades e diferentes épocas. Essa ocorrência sugere a permanência da linhagem na população, indicando a não erradicação de *Shigella*. A ocorrência de linhagens idênticas em localidades e épocas diferentes sugere também, a transmissão destas entre populações diferentes. Assim demonstramos claramente a veiculação das amostras de *Shigella* spp. entre as cidades circunvizinhas a Campinas e a veiculação das amostras no interior da cidade de Campinas inclusive, como por exemplo para *S. flexneri*, a transmissão das amostras Sf3 e Sf4 entre Jundiaí e Campinas e as amostras Sf23 e Sf25, transmissão entre Campinas e Mogi-Guaçu. Para as amostras de *S. sonnei*, a transmissão entre as cidades também foi observada em duas amostras de Bragança Paulista e Campinas, a amostra Ss9 de Cosmópolis para Campinas e outras amostras (Ss5, Ss8, Ss10, Ss11 e Ss12) de Campinas para Campinas (SP), como podemos verificar nas figuras 26 e 27.



Shigella flexneri

Figura 26: Período de isolamento (em anos) das 30 amostras de *Shigella flexneri* isoladas de pacientes em diferentes cidades. As amostras envolvidas em figuras geométricas pertencem ao mesmo grupo de PCR.



Shigella sonnei

Figura 27: Período de isolamento (em anos) das 30 amostras de *Shigella sonnei* isoladas de pacientes em diferentes cidades. As amostras envolvidas em figuras geométricas pertencem ao mesmo grupo de PCR.

DISCUSSÃO

A cidade de Campinas possui, aproximadamente, 1,2 milhões de pessoas e, juntamente com outras cidades de menor população, formam a região metropolitana de Campinas, constituindo um dos pólos industriais, tecnológicos, educacionais e culturais do Estado de São Paulo. Embora esta região possua um elevado índice de desenvolvimento humano, possui ainda, bolsões de pobreza, locais potenciais para a ocorrência e disseminação de doenças infecto-contagiosas fatais, como é o caso da Shigelose ou Disenteria Bacilar.

A Disenteria Bacilar acomete, em todo mundo, aproximadamente 165 milhões de pessoas por ano. Destes casos, 163 milhões ocorrem em países em desenvolvimento, dos quais, 112 milhões em crianças menores de cinco anos de idade. Do total de casos, um milhão de mortes ocorre (Kotloff *et al.*, 1999).

No Brasil, e em outros países, vários trabalhos (Almeida *et al.*, 1998, de Andrade *et al.*, 1999, Fagundes Neto & de Andrade, 1999, Fernandes & Trabulsi, 1968, Gomes *et al.*, 1991, Medeiros *et al.*, 2001; Piechaud *et al.*, 1974; Zuliani & Trabulsi, 1968), através da análise epidemiológica da Disenteria Bacilar, demonstraram que este tipo de infecção é importante causa de morbi-mortalidade.

Assim, amostras de *Shigella* spp isoladas na região metropolitana de Campinas entre 1987 e 2002, e pertencentes à coleção do Instituto Adolfo Lutz – Campinas, foram estudadas em relação às suas características clonais e epidemiológicas, com o objetivo de se verificar a possível transmissão das mesmas nesta região metropolitana.

A análise inicial das 60 amostras estudadas confirma os trabalhos de Fagundes Neto & Andrade (1999) e Medeiros *et al.* (2001) que indicam que crianças poderiam ser mais susceptíveis à infecção por *Shigella* spp.. As amostras, aqui estudadas, foram isoladas em 55% dos casos, de crianças menores de 5 anos de idade, e 58% (dados acumulativos) dos casos em crianças com até 10 anos de idade.

Esta porcentagem, de crianças infectadas por *Shigella* spp, é característica de um quadro endêmico (Kotloff *et al.*, 1999) que poderia ocorrer, provavelmente, por fatores como: a curta duração no período de amamentação, o baixo peso da criança ao nascer, o

nível sócio-econômico do país, a área geográfica onde reside e, ainda o acesso às condições básicas de saneamento (Rouquayrol & Almeida Filho, 2003).

No presente trabalho, estudamos as amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* através da determinação dos perfis genômicos de cada amostra, pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), amplificando regiões entre seqüências de DNA não codificantes. Além desta metodologia, outras características, tais como a análise do perfil de resistência antimicrobiana, o padrão plasmidial e capacidade de adesão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, foram estudadas comparando-se as mesmas com a ocorrência dos casos ao longo das estações climáticas, nas cidades e anos.

Os dados iniciais da ocorrência dos casos indicam uma distribuição sazonal da bactéria, característica extremamente comum em áreas endêmicas (Sears, 1996). Durante os meses mais quentes e úmidos do ano, (janeiro, fevereiro, março, abril, outubro, novembro e dezembro) ocorreram mais casos (70%) do que nos meses mais frios (30%). Este fato sugere uma correlação entre as condições ambientais e a disseminação do patógeno.

Os resultados dos testes de resistência a antimicrobianos, demonstraram que 83,33% das amostras de *S. flexneri* eram resistentes a Ampicilina (AP) 3,33% eram resistentes a Cefalotina (CF), 70% eram resistentes ao Cloranfenicol (CO), 86,67% à Estreptomicina (ET), 10% ao Sulfazotrim (SFT), 76,67% ao Sulfametoxazol (SUT) e 86,67% à Tetraciclina (TT). Estes valores diferenciam daqueles publicados por Lima *et al.* (1995), que demonstraram que 50% das amostras de *S. flexneri* eram resistentes à Ampicilina e 50% ao Sulfazotrim e por Oplustil *et al.* (2001) que demonstraram que 80% das amostras de *Shigella* spp. apresentavam resistência ao Sulfazotrim, 33% à AP e 10,9% ao CO.

No nosso trabalho, a maioria das amostras de *S. flexneri* apresentou-se multi-resistente, sendo que para 16,7% das mesmas apresentavam resistência a três tipos de antimicrobianos, 20% mostraram-se resistentes a 4 antimicrobianos, 50% resistentes a 5 antimicrobianos e 3,3% resistentes a seis antimicrobianos diferentes.

O perfil de resistência mostra que a maioria das amostras isoladas em algumas cidades, ou isoladas em Campinas, é extremamente similar, mas notamos também, que existem padrões para resistência bem variados como observado para as amostras Sf3, Sf7, Sf10, Sf15, Sf18, Sf20, Sf24, Sf25 e Sf26. (Tabela 1)

Os antimicrobianos mais prevalentes no perfil de resistência foram a AP (83,3%), CO (70%), ET (86,7%), Sulfametoxazol (76,7%) e a TT (86,7%) e os menos prevalentes, a Cefalotina (3,3%) e o Sulfazotrim (10%).

As amostras de *Shigella sonnei* mostraram um perfil de resistência diferenciado, sendo que para o antimicrobiano Ampicilina (AP) somente 6,6% das amostras eram resistentes, 26,67% mostraram-se resistentes frente à Estreptomicina (ET), 96,67% foram resistentes a Tetraciclina (TT) e 100% das amostras estudadas ofereceram resistência ao Sulfametoxazol (SUT). Nenhuma das amostras estudadas foi resistente aos antimicrobianos Cloranfenicol, Cefalotina e Sulfazotrim.

Na década de 60, pesquisadores já haviam demonstrado a existência de amostras multi-resistentes de *Shigella* spp. (Shears, 1996), sendo que, a partir desta época, uma porcentagem cada vez maior de microrganismos multi-resistentes foi isolada. Em nosso caso, 90% das amostras de *S. flexneri* (27 amostras) isoladas nos municípios de São João da Boa Vista, Jundiaí, Itapira, Mogi Guaçu e Campinas foram resistentes a, no mínimo três classes de antimicrobianos distintos, enquanto que apenas 30% (9) das amostras de *S. sonnei* apresentaram um perfil de multi-resistência.

O padrão de resistência observado em *Shigella* spp. pode indicar a presença de elementos genéticos extra-cromossômicos (plasmídios) capazes de transmissão vertical e horizontal entre linhagens (Shears, 1996), com esta troca de material genético ocorrendo tanto no organismo do hospedeiro, quanto no ambiente. Esta transferência genética pode levar ao aparecimento de linhagens resistentes de difícil tratamento pelos métodos terapêuticos convencionais (Martinez & Baquero, 2002).

Além dos plasmídios, outros elementos móveis como, por exemplo, elementos de transposição (transposons) poderiam ser responsáveis por estes fenótipos resistentes nas amostras estudadas e que por mecanismos de recombinação e transferência genética serem disseminados na população bacteriana (Nornark & Normark, 2002). Transposons, integrons e bacteriófagos poderiam ser capazes de carrear genes de resistência e virulência entre populações bacterianas, os quais se adicionariam aos processos de recombinação e mutações aleatórias no genoma, também responsáveis pelo aparecimento de mutantes resistentes (Martinez & Baquero, 2002).

A caracterização das amostras, quanto à capacidade de adesão e invasão de células eucarióticas *in vitro* (HEp-2 e HeLa) (Maurelli *et al.*, 1985), demonstrou existir tanto uma variabilidade nos processos e intensidade de adesão, quanto na capacidade de invasão (Tabelas 3 e 4). Esta variabilidade poderia ser devido à presença, ou ausência, de plasmídios nestas amostras.

Embora a presença de plasmídios possa ser considerada quando da caracterização molecular de linhagens, como realizado por Lima *et al.* (1997), e a extração de DNA plasmidial em nosso trabalho tenha demonstrado que a maioria das amostras possuía plasmídios de altos e baixos pesos moleculares, decidimos não considerar este tipo de caracterização, exatamente pela possibilidade da perda ou aquisição dos mesmos, pelos diferentes mecanismos de transferência genética, os quais poderiam estar presentes nas amostras estudadas.

Embora a utilização das técnicas de análise por PCR tenha demonstrado que as amostras bacterianas poderiam ser, em alguns casos diferenciadas, esta diferenciação não se mostrou satisfatória, por isso a opção de se fazer a análise levando-se em consideração todas as diferenças obtidas nas três técnicas. Através desta metodologia, as amostras foram classificadas em três grupos (A, B, C), podendo-se verificar que as amostras Sf1A e Sf1B (grupo A) isoladas em 11/02/87 em São João da Boa Vista, são idênticas e demonstram um grau de similaridade de 94% com a amostra Sf3, isolada em Jundiaí 3 anos mais tarde (em 23/04/90).

Ainda no grupo A, as amostras Sf2, Sf6 e Sf7 são idênticas, isoladas na mesma região de Campinas em datas diferentes (Sf2 no dia 03/10/89, Sf6 no dia 11/02/98 e Sf7 no dia 16/09/98), demonstrando um grau de similaridade de aproximadamente 97% com as amostras Sf8 (isolada em Campinas no dia 21/01/99), Sf13 (isolada em Campinas no dia 14/02/2000), Sf14 (isolada em Campinas no dia 02/05/2000), Sf15 (isolada em Campinas no dia 15/05/2000) e Sf26 (isolada em Campinas no dia 27/12/2001), que por sua vez, mostram-se idênticas.

As amostras Sf3 (isolada em Jundiaí no dia 23/04/90) e Sf4 (isolada em Campinas no dia 24/11/97) mostram-se idênticas e com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 91% com as amostras dos grupos que contém as amostras Sf2 e Sf8.

O grupo B, apresentou 9 amostras (Sf9, Sf10, Sf12A, Sf12B, Sf12C, Sf12D, Sf16, Sf17, Sf18). As amostras Sf12, isoladas em Itapira (A, B, C, D) são idênticas com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 89% com a mostra Sf9 (isolada em Campinas no dia 17/02/99). As amostras Sf10, Sf16, Sf17 e Sf18 são idênticas entre si, com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 80% com as amostras incluídas juntamente com as amostras Sf9 e Sf12.

O grupo C compreende 7 amostras (Sf11, Sf20, Sf21, Sf22, Sf23, Sf24, Sf25), onde as amostras Sf21, Sf22, Sf23 e Sf25 mostraram-se idênticas com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 81% com as amostras Sf11, Sf20 e Sf24, que por sua vez mostraram-se idênticas entre si.

Os grupos A e B tiveram um coeficiente de similaridade de aproximadamente 76% entre si e 62% com o grupo C.

As amostras de *Shigella sonnei* foram também classificadas em três grupos principais (A,B,C), incluindo-se no grupo A 11 amostras (Ss2, Ss4, Ss5, Ss8, Ss9, Ss10, Ss11, Ss12, Ss13, Ss14 e Ss15). No grupo B, 14 amostras (Ss1, Ss3, Ss6, Ss7, Ss16A, Ss16B, Ss16C, Ss16D, Ss16E, Ss16F, Ss16G, Ss16H, Ss16I, Ss20). Todas as amostras de número 16, isoladas em Campinas mostraram-se idênticas e apresentaram um coeficiente de similaridade de aproximadamente 85% com as amostras Ss1, Ss3, Ss6, Ss7, Ss20. As amostras Ss1 (isolada em Mogi-Guaçu no dia 14/02/97) e Ss3 (isolada em Limeira no dia 15/10/98) mostraram-se idênticas com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 96% com as amostras Ss7 e Ss20, que são idênticas entre si.

O grupo C compreendeu 5 amostras (Ss17, Ss18, Ss19A, Ss19B e Ss19C). As amostras Ss17 e Ss18 são idênticas e mostraram um coeficiente de similaridade de aproximadamente 92% com as amostras Ss19A, Ss19B, Ss19C e Ss19D que são idênticas. Os grupos B e C mostraram-se mais similares entre si (79%) do que o grupo A (77%).

Com isso, para as amostras de *S. flexneri* isoladas em 5 cidades da região de Campinas, São João da Boa Vista (2), Jundiaí (1), Itapira (4), Campinas (22) e Mogi-Guaçu (1) verificamos que: as amostras isoladas em São João da Boa Vista são idênticas, não encontrando uma amostra similar a estas. O mesmo deu-se com as amostras isoladas em Itapira. A amostra Sf3 isolada em Jundiaí é idêntica à amostra Sf4 isolada em Campinas alguns anos mais tarde. As 22 amostras isoladas na cidade de Campinas foram classificadas

em 8 padrões (ou tipos). Para elas, 5 tipos incluem a maioria dos casos com as amostras: um grupo com 3 amostras (Sf12, Sf6 e Sf7), um outro grupo com 6 amostras (Sf8, Sf13, Sf14, Sf15, Sf19 e Sf26). Um terceiro grupo com as amostras (Sf11, Sf20 e Sf24), um quarto grupo com 4 amostras (Sf10, Sf16, Sf17, Sf18) e um quinto grupo com 3 amostras (Sf21, Sf22 e Sf23). As amostras Sf4, Sf5 e Sf9 apresentaram um padrão único e diferente para cada uma destas três amostras. A amostra Sf25 isolada em Mogi-Guaçu foi idêntica às amostras Sf21, Sf22 e Sf23 isoladas em um período posterior na cidade de Campinas.

Para as amostras de *S. sonnei* isoladas em 6 cidades da região de Campinas, uma figura similar à de *S. flexneri* foi obtida. A maioria das amostras (23) foi isolada na cidade de Campinas. Na cidade de Cosmópolis somente uma amostra foi isolada (Ss9) exibindo um padrão idêntico àquele observado nas amostras Ss5 (isolada em Campinas no dia 10/03/2000) e Ss8 (isolada em Campinas no dia 02/06/2000) e idêntico também às amostras Ss10, Ss11 e Ss12 isoladas na cidade de Campinas nos anos de 2000 e 2001 respectivamente.

A amostra Ss1 isolada na cidade de Mogi-Guaçu em 1997 mostrou um padrão idêntico à amostra Ss3 isolada na cidade de Limeira em 1998. A amostra Ss2 isolada na cidade de Bragança Paulista em 1998 mostrou também um padrão idêntico a amostra Ss4 isolada meses mais tarde (1999) na cidade de Campinas. As amostras Ss19A, Ss19B e Ss19C isoladas na cidade de Vinhedo, foram idênticas entre si, mas estas amostras evidenciaram um padrão completamente diferente das amostras isoladas nas cidades circunvizinhas. As 23 amostras isoladas na cidade de Campinas e classificadas em 7 padrões diferentes foram: 9 amostras para um primeiro grupo (Ss16A, Ss16B, Ss16C, Ss16D, Ss16E, Ss16F, Ss16G, Ss16H e Ss16I), outro grupo com 5 amostras (Ss5, Ss8, Ss10, Ss11, Ss12), outro com 3 amostras (Ss13, Ss14 e Ss15), um grupo com 2 amostras (Ss17 e Ss18). Ss4 e Ss6 mostraram um padrão singular para cada amostra.

Estes resultados demonstram a ocorrência de amostras idênticas de *Shigella* spp em diferentes localidades e diferentes épocas. A ocorrência de amostras idênticas na mesma localidade em épocas diferentes sugere a permanência da amostra na população, indicando a não erradicação de *Shigella*. A ocorrência de amostras idênticas em localidades e épocas diferentes sugere a transmissão destas entre populações diferentes. Assim demonstrou-se a

veiculação das amostras de *Shigella* spp. entre as cidades que fazem parte da região metropolitana de Campinas

Analisando os padrões de bandas obtidos pelas metodologias ERIC-PCR, REP-PCR e DRE-PCR, das amostras de *S. flexneri* e *S. sonnei*, é possível concluir que na população estudada não existe amostra que possa ser considerada epidêmica, dado o grau de dissimilaridade genética observado entre as amostras. Por meio desta observação fica claro que o presente estudo trata de amostras endêmicas isoladas na região de Campinas, não tendo assim, ocorrido nenhuma epidemia de *Shigella* spp. nesta região no período em que as amostras foram isoladas. Uma epidemia consiste na rápida disseminação de uma determinada amostra de patógeno em um curto período de tempo. Geralmente em se tratando de epidemia, as amostras de diferentes pacientes estariam geneticamente mais relacionadas do que em casos endêmicos (NormarK & NormarK, 2002).

Esses dados indicam que a transmissão das amostras de *Shigella* spp. entre as cidades da região de Campinas, ocorre entre pessoas e entre cidades e que algumas amostras são responsáveis pela maioria dos casos ocorridos. Estas evidências requerem intervenções para um controle de transmissão e para os casos de multi-resistência antimicrobiana de *Shigella* spp.. Sem dúvida nenhuma, o controle para tais evidências, é muito complexo, pelas condições sócio-político-culturais das pessoas envolvidas e pelas condições geográficas, o que demonstra a necessidade premente em se alertar as autoridades sanitárias responsáveis para que, efetivos controles na saúde pública sejam estabelecidos.

CONCLUSÕES

1. A multi-resistência a antimicrobianos apresentada pela maioria das amostras de *S. flexneri* e por parte das amostras de *S. sonnei* demonstra a presença de amostras resistentes na região de Campinas e, também sugere a ocorrência de utilização indiscriminada de antimicrobianos nas populações analisadas.
2. Os experimentos de adesão em células HEp-2 e HeLa demonstraram que as amostras de *Shigella* spp. apresentaram variabilidade no processo e, também, na intensidade de adesão o que, sugere a presença de estruturas em sua superfície que as permitem reconhecer e aderir células diferentes das epiteliais intestinais.
3. A análise do perfil plasmidial das amostras de *Shigella* spp. mostra a presença de plasmídios de alto e baixo peso molecular em todas as amostras, sugerindo que estes elementos genéticos móveis podem estar associados à transmissão de resistência a antimicrobianos entre *Shigella* spp. e de outras características apresentadas pelas amostras.
4. As metodologias de amplificação das seqüências ERIC e REP mostraram maior eficiência em discriminar amostras de *Shigella* spp. do que a amplificação de seqüências DRE.
5. A análise clonal demonstrou a ocorrência de amostras idênticas em diferentes épocas na mesma localidade, sugerindo a permanência de amostras específicas nas cidades da região de Campinas, o que demonstra a não erradicação do patógeno.
6. A análise clonal também demonstra a ocorrência de amostras idênticas em diferentes localidades e épocas sugerindo a transmissão de uma mesma amostra entre cidades diferentes da região de Campinas.
7. O grau de similaridade genômica apresentado entre as amostras com a análise do dendrograma consenso (ERIC-PCR, REP-PCR e DRE-PCR), demonstrou que não

existe uma amostra epidêmica de *Shigella* spp. na região de Campinas sugerindo que os casos de Shigelose ocorridos nesta região, durante os períodos aqui analisados, foram causados por amostras endêmicas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Almeida, M. T.; Silva, R. M.; Donaire, L. M.; Moreira, L. E.; Martinez, M. B. (1998) Enteropathogens associated with acute diarrheal in children. *J. Pediatric*. (Rio de Janeiro), **74**: 291-298.
2. Allaoui, A.; Mounier, J.; Prévost, M.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1992) icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol. Microbiol.*, **6**: 1605-1616.
3. Ashekenazi, S.; Levy, I.; Kazaronovski, V.; Samra, Z. (2003) Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**: 427-429.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Struhl, K., Moore, D. D., Smith, J. A. e Seidman, J. G. F. (1988) Current Protocols in Molecular Biology. *Greene Publishing Associates, Brooklyn, N.Y.*
5. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-496.
6. Bennish, M. J.; Harris, J. R.; Wojtyniak, B. J.; Struelens, M. (1990) Death in Shigellosis: Incidence and Risk Factors in Hospitalized Patients. *J. Infect. Dis.*, **161**: 500-506.
7. Bier, Otto. Microbiologia e Imunologia. 30 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990.
8. Boccard, F.; Prentki, P. (1993) Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. *EMBO J.*, **12**: 5019-5027.
9. Brenner, D. J.; Fanning, G. R.; Skerman, F. J.; Falko, W. S. (1972) Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J. Bacteriol.*, **109**: 953-965.
10. Brenner, D. J.; Fanning, G. R.; Miklos, G. V.; Steigerwalt, A. G. (1973) Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 1-7.

11. Brenner, D. J.; Steigerwalt, A. G.; Gail Wathen, H.; Gross, R. J.; Rowe, B. (1982) Confirmation of aerogenic strains of *Shigella boydii* 13 and further study of *Shigella* serotypes by DNA relatedness. *J. Clin. Microbiol.*, **16**: 432-436.
12. Brocchi, M.; Sperandio, V.; Silveira, W. D. (1998) Mecanismos Moleculares de *Shigella*. In: **Série Monografias nº 8**: 41-61. Ribeirão Preto: Ed. SBG. São Paulo.
13. Casalino, M.; Nicolett, M.; Salvia, A.; Colonna, B.; Pazzani, C.; Calconi, A.; Mohamud, K. A.; Maimone, F. (1994) characterization of endemic *Shigella flexneri* strains in Somalia: Antimicrobial resistance, plasmid profiles and serotype correlation. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 1179-1183.
14. Coimbra R. S.; Lenormand, P.; Grimont, F.; Bouvet, P.; Matsushita, S.; Grimont, P. A. D. (2001) Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 618-621.
15. de Andrade, J. A.; de Oliveira, J. O.; Fagundes Neto, U. (1999) Lethality in hospitalized infants with acute diarrhea: risk factors associated with death. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, **45**: 121-127.
16. Dimri, G. P.; Rudd, K. E.; Morgan, M. K.; Bayat, H.; Ames, G. F. L. (1992) Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and other enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, **174**: 4583-4593.
17. Dodd, C. E. R.; Jones, D. A. (1982) A Numerical Taxonomic Study of the Genus *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.*:**128**: 1933-1957.
18. Dorman, C. J. (1995) DNA topology and global control of bacterial gene expression: implications for the virulence gene expression. *Microbiol.*, **141**: 1271-1280.
19. DuPont, H. L.; Levine, M. M.; Hornick, R. B.; Formal, S. B. (1989) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.*, **159**: 1126-1128.
20. Fagundes Neto, U.; de Andrade, J. A. (1999) (Acute diarrhea and malnutrition: lethality risk in hospitalized infants. *J. An. Coll. Nutr.*, **18**: 303-308.

21. Farmer, J. J. L.; Kelly, M. T. (1991) Manual of Clinical Microbiology, In: Balows, A.; Hausler, W. J. J.; Herrmann, K. L. ; Isenberg, H. D.; Shadomy, H. J. (1991) *American Society for Microbiology*. Washington 360-383.
22. Fernandes, M. R.; Trabulsi, L. R. (1968) Infectious resistance in pathogenic enteric organisms isolated in São Paulo (preliminary report). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **10**: 52-53.
23. Frankel, G.; Giron, J. A.; Valmassoi, J.; Schoolnik, G. K. (2001) Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol. Microbiol.*, **3**: 1729-1734.
24. Gilson, E.; Perrin, D.; Hofnung, M. (1990) DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA implications for bacterial chromosome organization. *Nucleic. Acids Res.*, **18**: 3941-3952.
25. Goldberg, M. B.; Sansonetti, P. J. (1993) *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.*, **61**: 4941-4946.
26. Gomes, T. A.; Rassi, V.; MacDonald, K. L.; Ramos, S. R.; Trabulsi, L. R.; Vieira, M. A.; Guth, B. E.; Candeias, J. A.; Ivey, C.; Toledo, M. R. (1991) Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brasil. *J. Infect. Dis.* **164**: 331-337.
27. Gupta, A.; Polyak, S.; Bishop, R. D.; Sobel, J.; Mintz, E. D. (2004) Laboratory-Confirmed Shigelosis in the United states, 1989-2002: Epidemiologic Trends and Patterns. *Clin. Infect. Dis.*, **7**: 11372-1377.
28. Hale, T. L.; Oaks, E.V.; Formal, S.B. (1985) Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **50**: 620-626.
29. Hale, T. L. (1991) Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol. Rev.*, **55**: 206-224.
30. Haider, K.; Hug, M. I.; Samadi, A. R.; Ahmad, K. (1985) Plasmid characterization of *Shigella* species from children with Shigellosis and asymptomatic excretor. *Journ. Antimic. Chemo.*, **16**: 691-698.

31. High, N.; Mounier, J.; Prevost, M. C.; Sansonetti, P. J. (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole). **EMBO J. 11 (5):** 1991-1999.
32. Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelber, E. A. Microbiologia Médica. (2000) 21ª Edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**.
33. Jennison, A. V.; Verma, N. K. (2004) Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiol. Rev., 28:** 43-58.
34. Jin, Q.; Yuan, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Shen, Y.; Lu, W.; Wang, J.; Liu, H.; Yang, J.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, G.; Wu, H.; Qu, D.; Dong, J.; Sun, L.; Xue, Y.; Zhao, A.; Gao, Y.; Zhu, J.; Kan, B.; Ding, K.; Chen, S.; Cheng, H.; Yao, Z.; He, B.; Chen, R.; Ma, D.; Qiang, B.; Wen, Y.; Hou, Y.; Yu, J. (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. **Nucleic. Acids. Res., 30:** 4432-4441.
35. Joklik, W. K.; Willet, H. P.; Amos, D. B.; Wilfert, C. M. (1994) Eds: Zinsser Microbiología. **Editora Médica Panamericana**.
36. Kado, C. I.; Liu, S. T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol., 145:** 1365-1373.
37. Karlin, S.; Ladunga, I.; Blaisdell, B.E. (1994) Heterogeneity of genomes: measures and values. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91:** 12837-12841.
38. Kopecko, D.; Holcombe, J.; Formal, S.B. (1979) Molecular characterization of plasmids from virulent and spontaneously occurring avirulent colonial variants of *Shigella flexneri*. **Infect. Immun., 24:** 580-582.
39. Kotloff, K. L.; Winickoff, J. P.; Ivanoff, B.; Clemens, J. D.; Swerdlow, D. L.; Adak, G. K.; Levine, M. M. (1999) Global burden of *Shigella* infections: implication for vaccine development and implementation. **WHO Bull., 77:** 651-666.
40. Lan, R.; Lumb, B.; Ryan, D.; Reeves, P. R. (2001) Molecular evolution of Large Virulence Plasmid in *Shigella* clones and Enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infect. Immun., 69:** 6303-6309.
41. Lan, R.; Reeves, P. R. (2002) *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. **Microbes and Infection., 4:** 1125-1132.

42. Lancellotti, M.; Brocchi, M.; Silveira, W. D. (2006) Bacteria-induced apoptosis: an approach to bacterial pathogenesis. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. **23**: 75-86.
43. Lima, A. A. M.; Lima, N. L.; Pinho, M. C. N.; Barro Jr, E. A.; Teixeira, M. J.; Martins, M. C. V.; Guerrant, R. L. (1995) 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. *Antimic. Ag. Chemo.*, **39**: 256-259.
44. Lima, A. A. M.; Sidrim, J. J. C.; Lima, N. L.; Titlow, W.; Evans, M. E.; Greenberg, R. N. (1997) Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1061-1065.
45. Liu, P. Y.; Lau, Y.; Hu, B.; Shyr, J.; Shi, S.; Tsai, W.; Lin, Y.; Tseng, C. (1995) Analysis of Clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1779-1783.
46. Lupski, J. R.; Weinstock, G. M. (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol* **174**: 4525-4529.
47. Martinez, J. L.; Baquero, F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 647-679.
48. Maurelli, A. T.; Blackmon, B.; Roy Curtis III. (1984) Temperature-dependent expression of virulent genes in *Shigella* species. *Infect. Immun.*, **43**:195-201.
49. Maurelli, A. T.; Baudry, B.; D'Hauteville, H.; Hale, T. L.; Sansonetti, P. J. (1985) Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, **49**: 164-171.
50. Medeiros, L. C.; Hillers, V. N.; Kendall, P. A.; Mason, A. (2001) Food safety education: what should we be teaching to consumers? *J. Nutr. Educ.* **33**: 108-113
51. Ménard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis on the *ipa* genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol* **175**: 5899-5906.

52. Ménard, R.; Sansonetti, P. J. (1994) *Shigella flexneri*: isolation of noninvasive mutants of Gram-negative pathogens. ***Methods. Enzymol.*, 236: 293-259.**
53. Ménard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1996) The secretion of the *Shigella flexneri* IpaA invasions is induced by the epithelial cell and controlled by IpaD. ***EMBO J.*, 13: 5293-5302.**
54. Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular biology. Cold Spring harbor ***Lab. Press.***
55. Mounier, J.; Vasselon, T.; Hellio, R.; Lesourd, M.; Sansonetti, P. J. (1992) *Shigella flexneri* enters Human Colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. ***Infect. Immun.*, 60: 237-248.**
56. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Kobayashi, G. S.; Pfaller, M. A. (1998) Medical Microbiology, 3d Edition, ***Mosby-year Book St Louis Missouri.***
57. Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; Tenover, R. C. (2003) Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. Washington-DC: ***ASM Press.***
58. Newbury, S. F.; Smith, N. H.; Higgins, C. F. (1987) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. ***Cell.*, 51: 1131-1143.**
59. Newbury, S. F.; Smith, N. H.; Robinson, E. C.; Hiles, I. D.; Higgins, C. F. (1987a) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. ***Cell.*, 48: 297-310.**
60. Nornark, B. H.; Nornark, S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. ***Journal of Internal Medicine.* 252: 91-106.**
61. Ochman, H.; Whittam, T. S.; Caugant, D. A.; Selander, R. K. (1983) Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. ***J. Gen. Microbiol.*, 129: 2715-2726.**
62. Olsnes, S.; Reisbig, R.; Eiklid, K. (1981) Subunit structure of *Shigella* cytotoxin. ***J. Biol. Chem.*, 25: 8732-8738.**
63. Oplustil, C. P.; Nunes, R.; Mendes, C.; Resistnet Group Multicenter. (2001) Evaluation of Resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. Isolated from Clinical Specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program Braz. ***J. Infect. Dis.*, 5:8-12.**

64. Parsot, C. (2005) *Shigella* spp. And enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. ***FEMS Microbiol. Lett.*, 252:** 11-18.
65. Pfaller, M. A.; Wendt, C.; Hollis, R. J.; Wenzel, R. P.; Fristchel, S. J.; Neubauer, J. J.; Herwaldt, L.A. (1996) Comparative evaluation of automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoreses for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. ***Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 25:**1-8.
66. Philpott, D. J.; Edgeworth, J. D.; Sansonetti, P. J. (2000) The Pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. ***Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 355:** 575-586.
67. Piechaud, D.; Szturm-Rubinstein, S.; Pessoa, G. (1974) Diversity of resistance types among *Shigella* in São Paulo (Brasil). ***An. Microbiol.*, 125:** 581-584.
68. Prado, D.; Murray, B.E.; Cleary, T. G.; Pickering, L. K. (1987) Limitations of using plasmid pattern as an epidemiological tool for clinical isolates of *Shigella sonnei*. ***J. Infect. Dis.*, 155:** 314-316.
69. Pupo, G. M.; Lan, R.; Reeves, P.R. (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:** 10567-10572.
70. Reisbig, R.; Olsnes, S.; Eiklid, K. (1981) The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. ***J. Biol. Chem.*, 25:** 8739: 8744.
71. Renders, N.; Römling, U.; Verbruch, H.; Van Belkum, A. (1996). Comparative typing *Pseudomonas aeruginosa*, by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. ***J. Clin. Microbiol.*, 34:** 3190-3195.
72. Riley, L.W.; Friedman, R. C.; Stoeckle, M. Y.; Johnson, Jr. W. D. (1995). Double-Repetitive-Element PCR Method for Subtyping *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. ***J. Clin. Microbiol.*, 33 – 5:** 1383-1384.
73. Rohlf, F. J. (2000) NTSYSpc Numeral Taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.10m. ***Applied Biostatistics***, Setauket, NY.

74. Rolland, K.; Lambert-Zechovsky, N.; Picard, B.; Denamur, E. (1998) *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains from *E. coli*. ***Microbiology.***, **144**: 2667-2672.
75. Rouquayrol, M. Z., Almeida Filho, N. (2003) Epidemiologia, História Natural e Prevenção de Doenças. In: ***Epidemiologia & Saúde***. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. – 17-35.
76. Salyers, A. A.; Whitt, D. D. (1994) *Shigella* infection. In: ***Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach***. Washington: ASM Press – 229-243.
77. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) ***Molecular Cloning: a Laboratory Manual***. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
78. Sansonetti, P. J.; Kopecko, D. J.; Formal, S. B. (1981) *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. ***Infect. Immun.***, **34**: 75-83.
79. Sansonetti, P. J.; Kopecko, D. J.; Formal, S. B. (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. ***Infect. Immun.***, **35**: 853-860.
80. Sansonetti, P. J.; Hale, T. L.; Dammin, G.J.; Kapfer C.; Colins, H.; Formal, S. B. (1983) Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. ***Infect. Immun.***, **39**: 1392-1402.
81. Sansonetti, P. J.; Mournier, J.; Prévost, M. C.; Merège, R. M. (1994) Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. ***Cell.***, **76**: 829-839.
82. Sansonetti, P. J.; Arondel, J.; Cantey, J. R.; Prevost, M. C.; Huerre, M. (1996) Infection of rabbit Peyer's patches by *Sigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. ***Infect. Immun.***, **64**: 2752-2764.
83. Sansonetti, P. J.; Phalipon, A. (1999) M Cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. ***Semin. Immun.***, **11**: 193-203.
84. Sansonetti, P. J. (2001) Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. ***FEMS Microbiol. Rev.***, **25**: 3-14.

85. Sasakawa, C.; Kamata, K.; Sakai, T.; Murayama, S. Y.; Makino, S.; Yoshikawa, M. (1986) Molecular alterations of the 140 MDa plasmid associated with loss of virulence and Congo Red binding activity in *Shigella flexneri*. ***Infect. Immun.*, 51:** 470-475.
86. Sasakawa, C.; Kamata, K.; Sakai, T.; Makino, S.; Yamada, M.; Okada, N.; Yoshikawa, M. (1988) Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri*. ***J. Bacteriol* 170:** 2480-2484.
87. Sasakawa, C.; Adler, B.; Tobe, T.; Okada, N.; Nagai, S.; Komatsu, K.; Yoshikawa, M. (1989) Functional organization and nucleotide sequence of virulence region-2 on the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* 2a. ***Mol. Microbiol.*, 3:** 1191-1201.
88. Scaletsky, I. A. C; Silva, M. L. M; Trabulsi, L. R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. ***Infect. Immun.* 45:** 534-536.
89. Sears, C. L.; Kaper, J. B. (1996) Enteric bacterial toxins: Mechanism of action and linkage to intestinal secretion. ***Microbiol. Rev.*, 60:** 167-215.
90. Sharples, G. J.; Lloyd, R. G. (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. ***Nucleic Acids Research.*, 18:** 6503-6508.
91. Shears, P. (1996) *Shigella* infections. ***Ann. Trop. Méd. Parasitol.*,90:** 105-114.
92. Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B.; Paixão, G. C.; Lima, S. B.; Filho, R. E. M.; Rocha, M. F. G.; Lima, A. A. M. (1998). Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. ***Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31:** 263-270.
93. Small, P.; Blankenhorn, D.; Welty, D.; Zinser, E.; Slonczewski, J. L. (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. ***J. Bacteriol* 176:** 1729-1737.
94. Suzuki T.; Sasakawa, C. (2001) Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. ***Infect. Immun.*, 69:** 5959-5966.

95. Tenover, F. C.; Arbeit, R.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; Hebert, G. A.; Hill, B.; Hollis, R.; Jarvis, W. R.; Kreiswirth, B.; Eisner, W.; Maslow, J.; McDougal, L. K.; Miller, J. M.; Mulligan, M.; Pfaller, M. A (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. ***J. Clin. Microbiol.***, **32**: 407-415.
96. Thong, K. L.; Puthucheary, S. D.; Yasin, M. R. (2005) Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. ***BMC Infect. Dis.***, **5**: 1-7.
97. Venkatesan, M. M.; Goldberg, M. B.; Rose, D. J.; Grotbeck, E. J.; Burland, V.; Blattner, F. R. (2001) Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. ***Infect. Immun.***, **69**: 3271-3285.
98. Versalovic, J.; Koeth, T.; Lupski, R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and applications to fingerprint of bacterial genomes. ***Nucl. Ac. Reser.***, **19**: 6823-6831.
99. Viridi, J. S. & Sachdeva, P. (2004) Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. ***FEMS Microbiol. Rev.***, **240**: 193-201.
100. Wassef, J. S.; Keren, D. F.; Mailloux, J. L. (1989) Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. ***Infect. Immun.***, **57**: 858-863.
101. Wei, J.; Goldeberg, M. B.; Burland, V.; Venkatesan, M. M.; Deng, W.; Fournier, G.; Mayhew, G.; Plunkett III, G.; Rose, D.; Darling, A.; Mau, B.; Perna, N. T.; Payne, S. M.; Runyen-Janecky, L.; Zhou, S.; Schwartz, D. C.; Blattner, F. R. (2003) Complete genomic sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. ***Infect. Immun.***, **71**: 2775-2786.
102. Werner, E.; Holder, A. A.; Hoheisel (1997) Growth and storage YAC clones in Hogness Freezing Medium. ***Nucleic Acids Research***, **25**, **7**: 1467-1468.
103. Yang, F.; Ames, G. F. L. (1988) DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **85**: 8850-8854.

104. Yeh, F. C.; Yang, R. C.; Boyle, T. Popgene version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>,1999.
105. Zuliani, M. E.; Trabulsi, L. R. (1968) *In vitro* sensitivity of 166 *Shigella* strains isolated in São Paulo, Brazil, to sulphadiazine and five antibiotics **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10:** 70-77.
106. Zychlinsky, A.; Fitting, C.; Cavaillon, J. M.; Sansonetti, P. J. (1994) Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. **Journ. Clin. Investig., 94:** 1328-1332.