



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA DUARTE BONA

**INFECÇÃO POR *Shigella/Escherichia coli* ENTEROINVASIVA, GENES DE
VIRULÊNCIA E COPATÓGENOS EM CRIANÇAS DE ESTUDO CASO-
CONTROLE NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

FORTALEZA

2018

MARIANA DUARTE BONA

**INFECÇÃO POR *Shigella/Escherichia coli* ENTEROINVASIVA, GENES DE
VIRULÊNCIA E COPATÓGENOS EM CRIANÇAS DE ESTUDO CASO-CONTROLE
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B685i Bona, Mariana Duarte.
INFEÇÃO POR Shigella/Escherichia coli ENTEROINVASIVA, GENES DE VIRULÊNCIA E COPATÓGENOS EM CRIANÇAS DE ESTUDO CASO-CONTROLE NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO / Mariana Duarte Bona. – 2018.
110 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Patotipo Shigella/EIEC. 2. Genes de virulência. 3. Co-infecções. 4. Sintomatologia. 5. Severidade. I. Título.

CDD 610

MARIANA DUARTE BONA

**INFECÇÃO POR *Shigella/Escherichia coli* ENTEROINVASIVA, GENES DE
VIRULÊNCIA E COPÁTOGENOS EM CRIANÇAS DE ESTUDO CASO-CONTROLE
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Centro Universitário Christus - Unichristus

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará – UECE

A Deus, minha proteção.

À mamãe, minha maior saudade.
Ao meu pai e minha irmã, minhas fontes de força.
Ao meu namorado, meu companheiro de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por aceitar me orientar, pelos seus ensinamentos e pelo exemplo de pesquisador.

À Dra. Ila Lima e à professora Dra. Rossana Cordeiro, por aceitarem o convite para a banca de qualificação e pelas sugestões dadas ao trabalho. Aos professores Marcos Fábio e Tereza Bandeira por aceitarem o convite para a banca de defesa e pelas contribuições ao trabalho.

Aos meus amigos do LDI: Herlice Veras, Samilly Ribeiro, Mara Prata, Lyvia Magalhães, Raphaella Gondim, Júlio Werner, Clérber Ferreira, Adelvane Rodrigues e Rafaela Pankov, pela amizade, pelo convívio diário, pela disposição a sempre me ajudarem neste mestrado.

Aos meus amigos Ana Karolina Santos, Marília Maia e Thiago Freitas, pela amizade e ajuda na execução dos experimentos.

Ao meu amigo Pedro Quintela, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela ajuda com a preparação do projeto e em tirar as dúvidas quanto ao seguimento deste, mesmo estando longe.

À secretária do PPGCM, Ivone e Rita, por sempre me receberem muito bem na coordenação e por sanar minhas dúvidas com muita simpatia.

Aos funcionários do IBIMED, em especial ao José, Luciana, Ceiza e Charliene, por todo o suporte que me foi dado neste trabalho.

À toda a equipe do RECODISA (Dr. Domingos Barreto, Dra. Josi Quetz, Dra. Ila Lima, Dr. Alexandre Havt, Dr. Reinaldo Oriá, Dra. Marjorie Guedes, Dra. Noélia Lima, Dr. Alberto Soares, Dr. Richard Guerrant, Lúcia Alves, Maria Luzia, Rosânia, Cláudia, Rosa, Maria do Carmo, Verônica, Francisco Jr, Fabiana e Ana Barreto) que realizou o trabalho fora do laboratório, seja na coleta de amostras ou na aplicação de questionários.

Às crianças e famílias participantes do projeto RECODISA, que contribuíram com as amostras e dados do trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização do meu mestrado.

RESUMO

A *Shigella* spp. e a *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC) constituem o patotipo *Shigella*/EIEC e causam a Shigelose. Esta infecção configura-se em um importante problema de saúde pública mundial, principalmente na população infantil de países em desenvolvimento, devido a sua alta severidade clínica, inexistência de vacinas e elevada taxa de resistência antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo desenvolver primers para detecção de genes codificadores de virulência e avaliar a clínica relacionada à infecção intestinal pelo patotipo *Shigella*/EIEC detectado em amostras fecais de crianças de estudo caso-controle no Semiárido Brasileiro. Foi realizado um estudo caso-controle em seis diferentes cidades no Semiárido com 1200 crianças de 2 a 36 meses de idade distribuídas no grupo caso, quando apresentavam episódios de diarreia nas 24 horas anteriores a coleta, e no grupo controle, quando não apresentavam diarreia. As amostras fecais de cada criança foram coletadas e extraído seu DNA fecal para diagnóstico de patógenos utilizando a plataforma Luminex Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, Califórnia, EUA), onde obteve-se 148 (12,33%) amostras de fezes com DNA positivo para *Shigella*/EIEC. A partir destas 148 amostras, reextraíu-se o DNA fecal e foi feito o diagnóstico por PCR convencional. O DNA positivo para o patótipo foi utilizado para a pesquisa de genes de virulência. Os dados clínicos, populacionais e socioeconômicos das crianças foram obtidos por meio do questionário respondido pelos pais ou responsáveis das crianças. Os dados dos enteropatógenos co-infectantes com o patotipo foram obtidos de resultados da detecção pelo Luminex. Detectou-se o patotipo em 60% (42/70) das crianças do grupo caso e em 23% (18/78) do grupo controle, sendo associado à presença de diarreia ($p = 0,0021$, OR = 2,43, IC95% 1,384 a 4,279). Verificou-se que 91,6% (55/60) destas amostras positivas para o patotipo apresentavam co-infecções com pelo menos um outro enteropatógeno. Houve associação de co-infecção com *Salmonella* spp. e presença de dor abdominal ($p = 0,0262$; OR = 5,75; IC95% = 1,362 a 20,73). Foram pesquisados ao todo 28 genes de virulência, dos quais o mais prevalente foi o gene *iucB* (90%, 54/60) que codifica a aquisição de ferro pelos patógenos. Alguns genes detectados no estudo foram associados aos casos de diarreia: o gene *sen* ($p = 0,0267$; OR = 4,25; IC95% = 1,27 a 14,15), que codifica o fator da enterotoxina ShET1; os genes *ipgB2* ($p = 0,0267$; OR = 4,25; IC95% = 1,27 a 14,15) e *ipgB1* ($p = 0,0354$; OR = 3,66; IC95% = 1,12 a 11,9), que codificam o remodelamento da membrana das células do hospedeiro; e o gene *ospF* ($p = 0,0354$; OR = 3,66; IC95% = 1,12 a 11,9), que codifica a supressão da resposta pró-inflamatória do hospedeiro. Em relação as manifestações clínicas adicionais a diarreia, observou-se que as crianças do grupo caso apresentaram baixa prevalência de sintomas. Na análise do agrupamento de genes de virulência pesquisados neste estudo com dados dos sintomas clínicos, obteve-se associação de febre com presença do gene *virA* que codifica a disseminação intra e intercelular do patógeno ($p = 0,0005$; OR = 33; IC95% = 1,79 a 608). Os resultados demonstraram a associação de infecção entérica diarreica nessas crianças com a detecção de *Shigella*/EIEC. A avaliação da presença dos genes *sen*, *ipgB1*, *ipgB2* e *ospF* sugerem a associação dos fatores codificados por estes genes impactando na diarreia. Além disso, a presença do gene que codifica a disseminação celular de *Shigella*/EIEC foi associado à febre nas crianças. Os resultados também demonstraram alta frequência de co-infecções com *Shigella*/EIEC e a associação desta com *Salmonella* spp. foi correlacionado com dor abdominal.

Palavras-chaves: Patotipo *Shigella*/EIEC, genes de virulência, co-infecções, sintomatologia.

ABSTRACT

Shigella and *Escherichia coli* Enteroinvasive (EIEC) constitute the pathotype *Shigella*/EIEC that cause Shigellosis. This infection is an important world public health problem, mainly in the children in development countries, because its clinic severity, lack of vaccine and high rate of antimicrobial resistance. This study aimed to develop primers for virulence-related genes and to evaluate clinical symptoms of *Shigella*/EIEC intestinal infection of children from case-control study on Brazilian Semiarid. It was carried out a case-control study in six different cities of semiarid with 1200 children with 2 to 36 age months, distributed in the case group, when they had diarrheal episodes in the last 24 hours, and in the control group, when they had not diarrheal episodes. Fecal samples of each children were collected and its DNA was extracted for pathogens diagnosis by Luminex Bio-Plex[®] 200 (Bio-Rad, California, EUA), which 148 (12.33%) samples were obtained with positive DNA for *Shigella*/EIEC. From these 148 samples, fecal DNA was reextracted and the diagnosis was made by conventional PCR. The positive DNA for the pathotype was used for the detection of virulence genes. The clinic, demographics and socioeconomics data were obtained by questionnaire answered by children parents or responsables. The data of co-infectants enteropathogens with this pathotype were obtained from Luminex detection results. It was detected the pathotype in 7% (42/600) of case group children and in 3% (18/600) of control group, with association of pathotype detection and presence of diarrhea ($p = 0.0021$, OR = 2.43, IC95% 1.384 to 4.279). It was observed that 91.6% (55/60) of these pathotype positive samples had co-infections with least one other enteropathogen. There was association of co-infection with *Salmonella* spp. with abdominal pain presence ($p = 0.0262$; OR = 5.75; IC95% = 1.362 to 20.73). It was analyzed 28 virulence genes, of which the most prevalent is *iucB* gene (90%, 54/60). Some of these genes was associated with diarrhea cases: the gene *sen* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; IC95% = 1.27 to 14.15), which encodes the ShET1 enterotoxin; genes *ipgB2* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; IC95% = 1.27 to 14.15) and *ipgB1* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; IC95% = 1.12 to 11.9), which encodes the ruffling of membrane of host cells; and the gene *ospF* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; IC95% = 1.12-11.9), which encodes the suppression of host immune response. About clinical manifestations addicted to diarrhea, it was observed that the infected and symptomatic children had mild symptoms. The results demonstrated high frequency of *Shigella*/EIEC co-infections with least one other enteropathogen. The infection with *Salmonella* spp was associated with abdominal pain ($p = 0.0262$; OR = 5.75; 95% CI = 1.36 to 20.73). The results showed the association of diarrhea presence on these children with pathotype detection. The evaluation of presence of *sen*, *ipgB1*, *ipgB2* e *ospF* genes suggest the association of factors encoding by these genes with impact in diarrhea. Further, the presence of factor related with pathotype intra and intercellular spreading was associated with fever in children. In addition, it was observed high frequency of pathotype copathogens and abdominal pain presence associated with presence of co-infection with *Salmonella* spp.

Key words: *Shigella*/EIEC pathotype, virulence genes, co-infections, clinical symptoms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo do processo de invasão, replicação, apoptose e disseminação do patótipo <i>Shigella</i> /EIEC	17
Figura 2 – Fatores de virulência e suas funções na patobiologia da infecção pelo patótipo <i>Shigella</i> /EIEC	19
Figura 3 – Região do Semiárido Brasileiro e as seis cidades envolvidas no estudo	28
Figura 4 – Fotodocumentação dos géis de agarose a 2% com os produtos de PCR representativa dos testes de validação dos iniciadores para os painéis D, E, F, G e seus respectivos controles positivos	46
Figura 5 – Fotodocumentação do gel de agarose a 2% da PCR referente ao painel B em amostras do presente estudo	47
Figura 6 – Árvore de análise por classificação e regressão da presença de febre com a presença ou ausência de genes de virulência	49
Figura 7 – Distribuição da prevalência das co-infecções entre os grupos caso e controle do estudo.....	42
Figura 8 – Árvore de análise por classificação e regressão de co-infecção de <i>Shigella</i> /EIEC com <i>Salmonella</i> spp e presença ou ausência de sintomas clínicos	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição do gene, sequência de iniciadores, número de acesso ao GenBank, tamanho do produto amplificado e condições de reação da PCR única para a detecção de <i>Shigella</i> /EIEC	31
Tabela 2 – Descrição dos genes alvo, sequência dos iniciadores, número de acesso GenBank, tamanho dos produtos amplificados e condições das reações de PCR múltiplas da pesquisa de genes de virulência de <i>Shigella</i> /EIEC	33
Tabela 3 - Distribuição da detecção de <i>Shigella</i> /EIEC entre as cidades do estudo.....	37
Tabela 4 – Caracterização das crianças do estudo detectadas com o patotipo <i>Shigella</i> /EIEC quanto ao gênero, idade e alimentação	38
Tabela 5 – Caracterização das famílias das crianças detectadas com o patotipo <i>Shigella</i> /EIEC quanto a renda familiar e ao grau de escolaridade das mães	39
Tabela 6 – Caracterização das casas das crianças detectadas com o patotipo <i>Shigella</i> /EIEC quanto as condições de saneamento básico	40
Tabela 7 – Medidas antropométricas avaliadas das crianças com amostras positivas para <i>Shigella</i> /EIEC entre os grupos caso e controle	40
Tabela 8 – Genes codificadores de fatores de virulência e suas distribuições entre os grupos caso e controle do estudo	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Diarreias infecciosas	11
1.2 Patotipo <i>Shigella/Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	13
1.2.1 Caracterização do patótipo	13
1.2.2 Epidemiologia	15
1.2.3 Patobiologia	16
1.2.4 Fatores de virulência	19
1.2.5 Diagnóstico laboratorial	22
1.3 Manifestações clínicas e complicações da infecção por <i>Shigella</i> /EIEC.....	23
1.4 Tratamento e prevenção da Shigelose	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Aspectos éticos.....	29
4.2 Delineamento e local do estudo	29
4.3 Obtenção das amostras.....	30
4.4 Extração de DNA fecal	34
4.5 Detecção molecular de <i>Shigella</i> /EIEC	36
4.6 Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência	36
4.7 Avaliação dos dados clínicos, populacionais e antropométricos da população do estudo.....	41
4.8 Análise estatística dos dados	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Detecção molecular do patótipo <i>Shigella</i> /EIEC na população do estudo	42
5.2 Caracterização da população positiva para <i>Shigella</i> /EIEC quanto aos dados socioeconômicos, ambientais, antropométricos e clínicos	43
5.3 Desenvolvimento de reações de PCR multiplex para detecção de genes de virulência	47
5.4 Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência	49
5.5 Análise da presença de copatógenos.....	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	59
9. REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC.....	71
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	72
ANEXO C – FORMULÁRIO	74
ANEXO D – Manuscrito do Artigo em Processo de Submissão	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diarreias infecciosas

As diarreias infecciosas configuram-se em uma síndrome intestinal caracterizada, frequentemente, pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de patógenos. Essa síndrome é acompanhada de náusea, vômito, dores abdominais e diarreia. A transmissão ocorre, normalmente, pela ingestão de água ou alimentos contaminados, do contato pessoa a pessoa ou como resultado de higiene e saneamento básico precários (PETRI et al., 2008). Diversos tipos patogênicos podem estar associados à doença sejam bactérias, vírus ou protozoários (LANATA et al., 2013). A diarreia caracteriza-se quando há uma frequência de evacuações de 3 ou mais por dia ou quando há uma quantidade superior a 200g de fezes. Um episódio de diarreia é definido como uma sequência de dias com diarreia, intervalado por no mínimo 48 horas. Quanto a duração, a diarreia pode ser classificada em: diarreia aguda, quando os sintomas duram até 7 dias; diarreia prolongada quando a duração é entre 7 e 13 dias; diarreia persistente quando a duração é de mais de 13 dias; e diarreia crônica quando há sintomas com mais de 30 dias de duração (MOORE et al., 2010; DUPONT, 2016).

Essa patologia constitui um grande problema de saúde pública mundial, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade infantil, representando a segunda maior causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade (THIAM et al., 2017). Cerca de um terço das crianças que vivem em países em desenvolvimento, onde as condições higiênico-sanitárias desfavoráveis facilitam a disseminação de agentes patogênicos, é acometido por infecções entéricas com ou sem eventos diarreicos (HODGES et al., 2010; GUERRANT et al., 2013). Um estudo epidemiológico sobre diarreia infantil no mundo mostrou que, em 2010, 1.731 bilhões de episódios de diarreia ocorreram em crianças abaixo de cinco anos de idade e, em 2011, cerca de 700 mil episódios diarreicos levaram à morte, sendo mais de 70% dessas mortes em crianças abaixo de dois anos de idade (WALKER et al., 2013).

Nos últimos anos, o problema das diarreias infecciosas tornou-se pauta relevante para as autoridades governamentais, principalmente em países em desenvolvimento. Desse modo, os esforços da Organização Mundial de Saúde e Governos em programar medidas associadas a redução da severidade das infecções entéricas com ou sem diarreia em crianças, como a implementação da vacina para rotavírus, investimento em saneamento básico e a terapia do soro para reidratação oral (TRO), resultou na diminuição considerável das taxas de mortalidade, de

12,6 milhões de mortes/ano no início dos anos 90, para 6,6 milhões de mortes/ano, em 2012 (UNICEF, 2013). Contudo, ainda é alto o número de mortes por diarreias e, principalmente, a alta morbidade desta condição clínica permanece como alvo de preocupação mundial (BARTELT et al., 2013).

Um estudo caso-controle prospectivo multicêntrico entérico global intitulado Estudo Multicêntrico Entérico Global (*The Global Enterics MultiCenter Study - GEMS*), que englobou mais de 22 mil crianças de sete países da África e Ásia com até cinco anos de vida, elencou quatro patógenos como os mais importantes causadores de diarreia moderada a severa: rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (KOTLOFF et al., 2013). Outro estudo multicêntrico coorte, denominado Interações da Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil (*The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development – MAL-ED*), acompanhou crianças desde o nascimento até os dois anos de vida em oito países em desenvolvimento para investigação da diarreia em crianças que apresentavam a doença, mas não buscaram atendimento médico. Este coorte elencou os patógenos rotavírus, norovírus, *Campylobacter* spp, astrovírus, *Shigella* spp e *Cryptosporidium* como os principais causadores da diarreia da comunidade (PLATTSMILL et al., 2015).

A desnutrição é um fator de risco importante para a ocorrência de diarreias infecciosas (SCHARF et al., 2014). Um estudo de revisão de Guerrant e colaboradores (2013) analisou o impacto das infecções intestinais na diarreia, na desnutrição e nas doenças crônicas em crianças que vivem em situações de extrema pobreza. Os autores observaram que o comprometimento da resposta imune inata devido à desnutrição pode levar a uma maior susceptibilidade ao estabelecimento de infecções entéricas que, por sua vez, desencadeiam um estado de má-absorção de nutrientes devido ao dano tecidual e à inflamação intestinal, configurando-se assim em um ciclo denominado ciclo vicioso infecções entéricas-desnutrição e ainda observaram que este ciclo, na presença ou ausência de diarreia, tem sido associado a diversas consequências negativas ao desenvolvimento humano, como retardo no crescimento e prejuízo cognitivo da criança (GUERRANT et al., 2013).

Estudos tem discutido que as diarreias infecciosas podem gerar uma elevada demanda sobre os serviços ambulatoriais sobrecarregando a rede hospitalar (ADAIR et al., 2013). Além disso, a longo prazo, estas infecções podem levar à alterações no desenvolvimento físico e

cognitivo das crianças e ao desenvolvimento de doenças crônicas e morbidades, levando a um posterior prejuízo da capacidade produtiva humana (GUERRANT et al., 2013; ADAIR et al., 2013; COCCIOLILLO; COLLINS, 2015).

1.2 Patotipo *Shigella/Escherichia coli* Enteroinvasiva

1.2.1 Caracterização do patótipo

O microbiologista Kyoshi Shiga, em 1898, isolou um microrganismo de fezes disentéricas e descreveu-o como *Bacillus dysenteriae*. O gênero *Bacillus* foi escolhido devido à sua semelhança com o *Bacillus coli*, conhecido hoje como *Escherichia coli* (PUPO et al., 2000). Após a identificação do *Bacillus dysenteriae* por Shiga, outros pesquisadores identificaram microorganismos semelhantes, como Flexner em 1900 e Sonne em 1915 (TROFA et al., 1999).

A importância médica dos novos microrganismos levou à distinção destes dos microrganismos do gênero *Escherichia* e, em 1940, Ewing propôs classificar as novas espécies no gênero *Shigella* (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* e *Shigella boydii*) baseado nas características antigênicas de cada espécie (EWING, 1986). No entanto, vários estudos, baseados na evolução filogenética e genômica de tais gêneros, contrapõem-se à distinção de *Shigella* em espécies e à diferenciação entre *Shigella* e *Escherichia coli* (PUPO et al., 2000; LAN et al., 2001; JIN et al., 2002; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2003; LAN et al., 2004; PENG et al., 2009; YANG et al., 2007; SAHL et al., 2015; PETTENGILL et al., 2016).

Apesar das semelhanças entre *Shigella* e *E.coli* descrita por Shiga, as cepas de cada gênero podem diferenciar-se com base nas suas características bioquímicas e fisiológicas. Quase todas as cepas de *E. coli* são móveis, possuem a enzima lisina-descarboxilase (LDC), formam gás no processo de fermentação da glicose, fermentam lactose e são indol positivas. Enquanto as cepas de *Shigella* são imóveis, são LDC negativas, não produzem gás a partir da glicose, não fermentam lactose (apenas algumas cepas de *Shigella sonnei* conseguem fermentar vagorosamente) e são indol negativas (exceto algumas cepas de *Shigella flexneri*) (EWING, 1986; BOOP et al., 2003; MAURELLI, 2013).

A *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC) foi descoberta 50 anos após as cepas de *Shigella*, foi nomeada de “paracolón bacillus” e, mais tarde, designada por *E. coli* O124 (UDDIN et al., 2014). A partir disso, a separação clássica dos gêneros foi questionada, já que a EIEC apresenta algumas propriedades bioquímicas do gênero *Escherichia*, mas também outras

propriedades do gênero *Shigella* e, principalmente, o comportamento patogênico desta última (LAN et al., 2004; BELD et al., 2012). Os isolados de EIEC são imóveis e 70% destes são incapazes de fermentar lactose, são negativos para atividade da LDC e alguns sorotipos de EIEC compartilham antígenos-O idênticos com sorotipos de *Shigella* (BELD et al., 2012).

Escobar-Páramo e pesquisadores (2003) sugeriram hipóteses para a origem do patótipo *Shigella*/EIEC. Esses grupos teriam derivado de diferentes grupos de *E. coli* que adquiriram o plasmídeo de virulência (VP) independentemente, ou de um desconhecido doador ou de cepas de *Shigella* que já tinham o plasmídeo, e também observaram que VP e o cromossomo dos dois patógenos eram filogeneticamente similares.

Estudos genéticos de Lan e colaboradores (2004) baseados em sequenciamento de múltiplos genes de referência indicaram que a EIEC está mais relacionada geneticamente a *Shigella* do que as demais *E. coli* não-invasivas. Estudo *whole-genome* recente de genes de virulência de EIEC também indicaram esta relação próxima devido à observação de que EIEC compartilhou uma grande quantidade de grupos filogenéticos com *Shigella* e EIEC sem a presença das demais *E. coli* (HAZEN et al., 2016).

Estudos filogenéticos e genômicos de Pettengill e colaboradores (2016) utilizaram um grande número e diversidade de genomas de *Shigella* e EIEC e acrescentaram observações acerca da relação entre estes patógenos. A filogenética baseada em SNP mostrou que *Shigella* e EIEC desenvolveram-se independentemente com o plasmídeo de invasão sendo transferido antes da evolução deste dois patógenos, contrapondo-se aos achados de Escobar-Páramo e pesquisadores (2003), e que os sorogrupos de *Shigella* pertencem a mesma linhagem, não fazendo sentido separar o gênero *Shigella* em espécies. Por parte dos estudos genômicos baseados na investigação de genes específicos para o gênero *Shigella* e *E. coli*, não se encontraram genes específicos para cada e sim compartilhamento de “core” genes. Pettengill e colaboradores (2016) sugeriram então que *Shigella* deva ser alocada no gênero *E. coli*, sendo classificada como uma EIEC e ter sorotipos nomeados com O antígeno.

Estudo de Pavlovic e colaboradores (2011) propôs uma PCR em tempo real em que os pesquisadores acreditavam diferenciar os gêneros baseado na detecção de dois iniciadores: *uidA*, que codifica a enzima beta-glicuronidase presente em ambos patógenos, e *lacY*, que codifica a enzima lactose permease presente apenas na EIEC. Mas, a análise *in silico* de Pettengill e colaboradores (2016) observou que a sequência dos iniciadores indicados mostrava identidade

genômica entre os dois gêneros. Portanto, devido às semelhanças bioquímicas e patobiológicas e à evolução filogenética e genética de *Shigella* e EIEC, estudos tem tratado estes patógenos como um só patotipo *Shigella*/EIEC (KAPER et al., 2004; CROXEN et al., 2013; MAURELLI, 2013; PETTENGIL et al., 2016).

1.2.2 Epidemiologia

Devido à baixa quantidade de cepas necessárias para causar a infecção (cerca de 10 a 100 microorganismos), a infecção por *Shigella* configura-se em uma ameaça à saúde pública com notificações recorrentes. Dados da OMS estimaram uma ocorrência mundial de, aproximadamente, 191 milhões de casos em 2010 (KLIRCK et al., 2015).

Dois recentes estudos epidemiológicos multicêntricos reforçaram a importância de *Shigella* spp. em crianças de países em desenvolvimento na etiologia da diarreia, elencando o patógeno como um dos mais prevalentes, além de mostrar associação com disenteria (KOTLOFF et al., 2013; PLATTSMILL et al., 2015; LIU et al., 2016). Outros estudos também têm demonstrado a importância de *Shigella* spp. como causa de diarreia em países em desenvolvimento (BONKOUNGOU et al., 2013; RATHAUR et al., 2014; SAMBE-BA et al., 2013). Em um estudo realizado em Bangladesh que investigou especificamente a etiologia da disenteria em mais de duas mil crianças abaixo de cinco anos de idade, *Shigella* spp foi o principal agente causador, com 32% dos casos (FERDOUS et al., 2014). Em países desenvolvidos como Canadá, Espanha e Estados Unidos, diversos surtos diarreicos têm suas causas reportadas como espécies de *Shigella* spp (KOZAK et al., 2013; TORO et al., 2015; GARGANO et al., 2017; MCCRICKARD et al., 2018).

No Brasil, estudos tem observado baixa prevalência de detecção de *Shigella* spp. em amostras diarreicas de crianças. Na região do sudeste brasileiro, estudo de Sousa e colaboradores (2013) observou uma prevalência de 10,8% do patógenos entre crianças internadas em um hospital; no nordeste, Nunes e colaboradores (2012) observaram uma frequência similar a esse estudo também entre crianças de um hospital público. No norte do Brasil, Cruz e colaboradores (2014) observaram, uma prevalência ainda menor (2,2%) de *Shigella* spp. entre crianças internadas em três hospitais.

Na cidade de Fortaleza, estudo de Lima e colaboradores (1995) observou baixa prevalência de detecção de *Shigella* spp. em amostras diarreicas de crianças provenientes de uma

comunidade e de dois hospitais na cidade. No entanto, outro estudo posterior do mesmo grupo de pesquisa realizado por Quetz e colaboradores (2012) observou que *Shigella* foi o enteropatógeno mais frequentemente detectado em amostras diarreicas de crianças atendidas em um hospital de Fortaleza.

Enquanto as infecções por *Shigella* são bem notificadas pela vigilância epidemiológica, as infecções por *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC) são subnotificadas. Isso se deve a menor severidade das manifestações clínicas desta infecção, à não obrigatoriedade de notificação de casos, à maior dose infecciosa necessária (cerca de 10^8 microrganismos) e, principalmente, à sua falsa detecção como *Shigella* (CROXEN et al., 2013; MICHELACCI et al., 2015; PETTENGILL et al., 2016). Portanto, o impacto da infecção por EIEC na mortalidade e morbidade das doenças diarreicas ainda não está bem relatado.

No entanto, recentes surtos de infecção por EIEC chamam a atenção para este patógeno como uma possível ameaça à saúde pública. Esses casos foram reportados em funcionários de uma brigada de incêndio na Itália em 2012; em um caso esporádico de diarreia do viajante na Espanha em 2013; e em um surto de doença diarreica envolvendo 50 pessoas no Reino Unido em 2014. Todos estes casos foram associados a transmissão por alimentos contaminados (MICHELACCI et al., 2015).

1.2.3 Patobiologia

A infecção causada por *Shigella*/EIEC caracteriza-se pela destruição do epitélio do colón, devido a resposta inflamatória induzida após a invasão da mucosa pelas bactérias (PARSOT et al., 2005; BELD et al., 2012; CROXEN et al., 2013). Este quadro de infecção constitui a patologia denominada Shigelose que é transmitida via ingestão destes patógenos presentes em água e alimentos contaminados e, classicamente, reconhecida como derivada da infecção por *Shigella* spp. (LIMA et al., 2015).

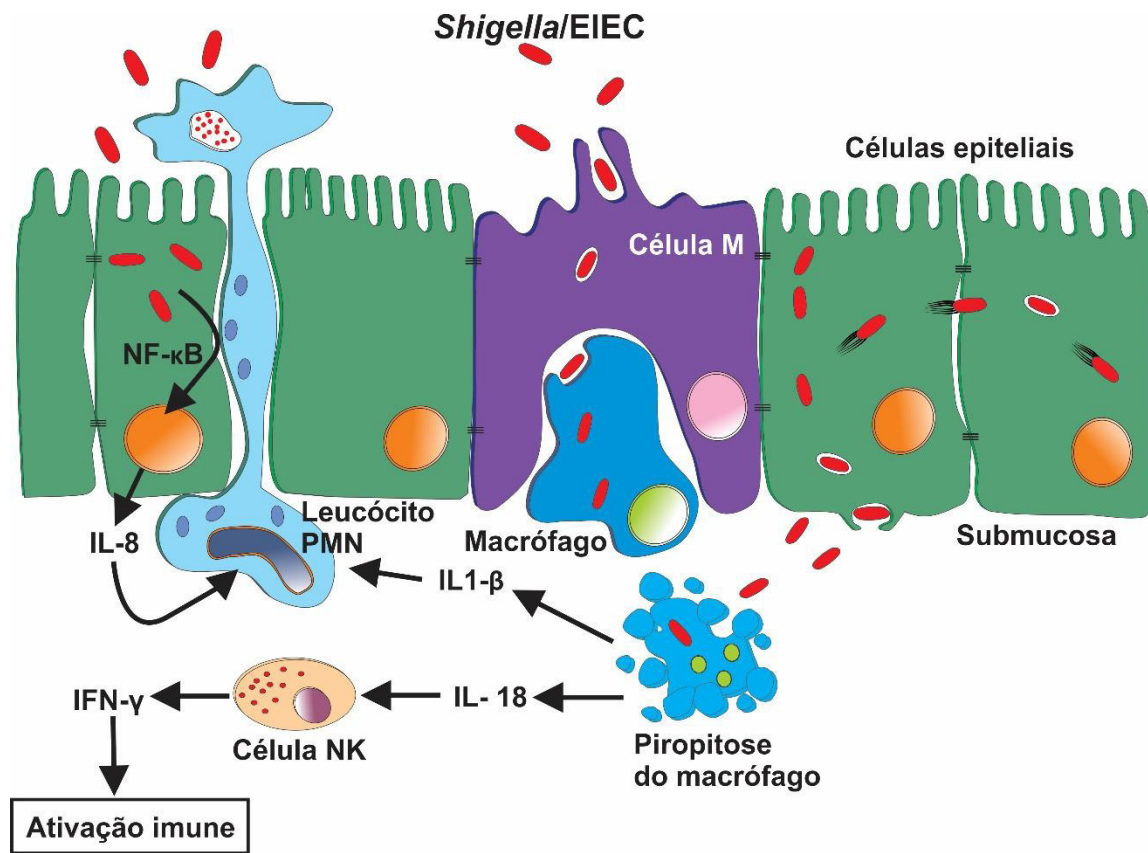
Ao chegar ao estômago, *Shigella*/EIEC possui a habilidade de resistir a acidez estomacal e assim transitar pelo intestino delgado chegando ao cólon onde estabelecem a infecção (MAURELLI, 2013). Essa resistência é um importante fator de virulência desses patógenos e, para isso, os lipolissacarídeos e a via da resistência ácida arginina-dependente executam importante papel nesse fator (MARTINIC et al., 2011; GOH et al., 2011).

Outro aspecto que deve ser superado é a temperatura. O mecanismo de regulação gênica é intimamente influenciado pelas variações de temperatura, através de sequências de RNA mensageiro de proteínas de choque térmico. Em *Shigella* spp., a absorção de ferro, regulada pela proteína ShuA, é fundamental para a replicação intracelular da bactéria e parece estar regulada por mecanismo de regulação gênica (LIMA et al., 2015).

A influência da microbiota na proteção contra a infecção por *Shigella* spp. ainda é incipiente, porém bastante promissora (ANDERSON et al., 2016). Neste contexto, estudos clínicos têm corroborado com avaliações *in vivo* de que o gênero *Lactobacillus*, componente da microbiota intestinal, é protetor contra infecções por *Shigella* spp. (LINDSAY et al., 2015).

Os microrganismos atravessam o epitélio intestinal pela superfície apical basolateral por meio das células M: células epiteliais membranosas que transportam antígenos do lúmen através da barreira intestinal para ação de linfócitos e macrófagos. Este processo, denominado transcitose, permite as bactérias atravessarem a barreira física de proteção do hospedeiro e serem expostas aos macrófagos na submucosa do trato gastrointestinal (MAURELLI et al., 2013; LIMA et al., 2015; THE et al., 2016). Na submucosa, as bactérias são fagocitadas pelos macrófagos, multiplicam-se intracelularmente e conseguem escapar dos fagossomos enquanto ocorre a apoptose dos macrófagos induzida pela ativação da inflamação dependente de caspase-1 que acaba liberando grandes quantidades de IL-1 β (UD-DIN et al., 2014). Em seguida, os microrganismos invadem as células epiteliais do colón, agora através da superfície basolateral via interação com integrinas $\alpha 5$ - $\beta 1$ e receptor CD44. A bactéria internalizada escapa do vacúolo endossomal e espalha-se para as células adjacentes movendo-se de célula a célula causando uma eficiente colonização intracelular (UD-DIN et al., 2014; AGAISSE, 2016) (FIGURA 1).

Figura 1 – Modelo do processo de invasão, replicação, apoptose e disseminação do patótipo *Shigella/EIEC*



Fonte: Adaptado de SCHROEDER e HILBI, 2008.

A **Figura 1** indica o processo patobiológico executado pelo patótipo *Shigella/EIEC*. Este atravessa a célula M pelo processo de transcitose sendo exposto ao macrófago que o fagocita. No entanto, o patótipo escapa do macrófago, induz piropitose e fica livre para invadir a célula epitelial através da submucosa. Ao invadir, ocorre a internalização do microrganismo por um vacúolo e em seguida a lise desse vacúolo deixando novamente o patótipo livre que irá disseminar-se entre as células epiteliais. A invasão de enterócitos, devido a destruição da barreira epitelial pelo patótipo, leva à liberação de IL-8 que sinaliza para o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Essa sinalização também é obtida pela piropitose do macrófago que libera IL-1β. O influxo de PMN desintegra o revestimento da barreira epitelial levando a entrada de mais bactérias exacerbando a infecção. A sinalização pró-inflamatória mediada pela liberação de IL-18 pelo macrófago ativa a resposta imune inata envolvendo células NK.

A invasão das células epiteliais do cólon leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-8 que, juntamente com IL-1β produzida pela apoptose dos macrófagos, sinalizam para o massivo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) até o local da infecção (FIGURA 1). Isso leva a uma intensa transmigração destas células pelo epitélio e consequente dano tecidual, desestabilização das junções firmes entre os colonócitos e intensa reposta inflamatória, quadro infeccioso característico da Shigelose (MAURELLI et al., 2013; UD-DIN et al., 2014).

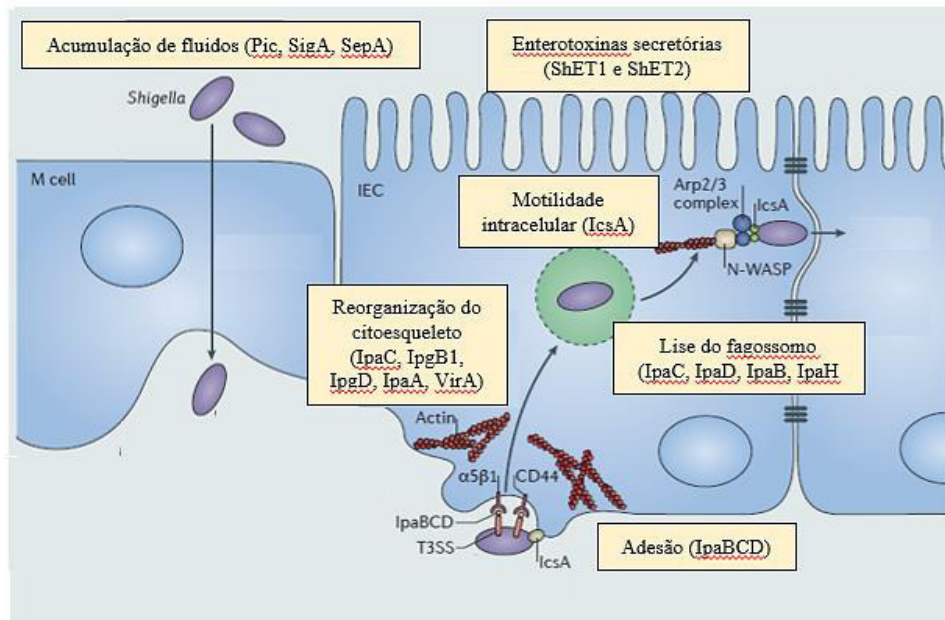
1.2.4 Fatores de virulência

A virulência de *Shigella*/EIEC é multigênica, envolvendo genes codificadores de virulência localizados no plasmídeo de virulência (pINV) e nas ilhas de patogenicidade do cromossomo destes patógenos (MAURELLI et al., 2013; HAZEN et al., 2016).

A invasão celular de *Shigella*/EIEC é mediada pelo plasmídeo de virulência, cuja região 37 kb possui os 34 genes codificadores de virulência necessários ao processo que estão organizados dentro de três operons (*ipa*, *mxi* e *spa*) (MAURELLI et al., 2013; LIMA et al., 2015). Os operons *mxi* e *spa* codificam proteínas que produzem subunidades do Sistema de Secreção do Tipo 3 (T3SS) e o operon *ipa* codifica proteínas plasmidiais de invasão (IpaA, B, C, D) secretadas pelo T3SS. Este sistema é largamente utilizado por patógenos de animais e plantas para distribuir fatores de virulência na superfície ou no interior das células do hospedeiro levando a reprogramação destas células de acordo com as necessidades dos patógenos (GALAN e WOLF-WATZ, 2006).

A adesão bacteriana à célula do hospedeiro é mediada pela proteína de invasão plasmidial IpaB e pelo complexo IpaBCD (ambos provenientes do operon *ipa*), os quais ligam-se ao receptor hialurônico CD44 e integrinas $\alpha 5$ - $\beta 1$ (CROXEN et al., 2013; MATTOCK et al., 2017). Outros efetores como IpaC, IpgB1, IpgD, IpaA e VirA tem sido observados causando reorganização do citoesqueleto do hospedeiro e desordem da membrana para promover a captação do patógeno pelo fagossomo. *Shigella*/EIEC escapa do fagossomo utilizando os efetores IpaB, C, D e ipaH7.8 os quais promovem a lise deste (CROXEN et al., 2013). IpaB e IpaH7.8 também promovem a morte dos macrófagos que fagocitam as bactérias (MATTOCK et al., 2017) (FIGURA 2).

Figura 2 – Fatores de virulência e suas funções na patobiologia da infecção pelo patótipo *Shigella*/EIEC



Fonte: Adaptado de THE et al., 2016.

A **Figura 2** indica alguns dos principais fatores de virulência do patótipo e suas respectivas funções relacionadas a patobiologia da infecção pelo patótipo *Shigella*/EIEC. Os fatores Pic, SigA e SepA são protease da família das SPATEs e são responsáveis pela acumulação de fluidos ajudando o patótipo a invadir a célula. Os fatores IpaBCD juntamente com o TSS3 são responsáveis pela adesão da bactéria a célula do hospedeiro pela submucosa. Os efetores IpaC, IpgB1, IpgD, IpaA, VirA promovem a captação do patótipo pelo fagossomo que é lisado pelos efetores IpaC, IpaD, IpaB, IpaH. O patótipo ficando livre na célula é levado a se disseminar para os enterócitos adjacentes através da motilidade intracelular gerada pelo fator IcsA, levando o patótipo a colonizar as demais células.

Outros efetores agem neutralizando a defesa imune do hospedeiro. Respostas inflamatórias do hospedeiro tais como a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a ativação da NFκB e a produção de citocinas são inibidas pelos efetores OspB, OspC1, OspZ, OspF, OspG, OspI, IpaH9.8, IpaH0722 (MATTOCK et al., 2017). Outras estratégias que *Shigella*/EIEC emprega para manipular e escapar da defesa imune do hospedeiro são a supressão da expressão de peptídeos antimicrobianos, a indução de apoptose em células dendríticas, a interferência na transmigração de linfócitos T e sua inibição, a apoptose de linfócitos B, a inibição da morte celular inflamatória mediada pela caspase-4 e a inibição da sua degradação mediada por autofagia das células. Nesses processos estão envolvidos alguns efetores, tais como IpgD, ShiA, IpaD, OspC3, VirA e IcsB (INGERSOLL e ZYCHLINSKY, 2006; CROXEN et al., 2013; MATTOCK et al., 2017).

Alguns efetores do T3SS são responsáveis pelo deslocamento intra e intercelular do patotipo. A motilidade intracelular é mediada pelo IcsA através do recrutamento da Proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) do hospedeiro e do complexo da proteína relacionada à actina 2/3 (ARP2/3), criando um sítio de nucleação para a polimerização direcional da actina a fim de impulsionar a bactéria através do citoplasma da célula hospedeira (EGILE et al., 1999). Além disso, estudos sugerem que VirA, o qual possui a capacidade de estimular a desestabilização de microtúbulos, é outro efector essencial que permite a disseminação dos patógenos através da densa malha de citoesqueleto intracelular (YOSHIDA et al., 2006). A disseminação intercelular ocorre por mecanismo semelhante a intracelular quando o patógeno é endocitado nas junções firmes tricelulares e um novo ciclo de lançamento-replicação-propagação ocorre (THE et al., 2016) (FIGURA 2).

Dentro das células epiteliais intestinais, o efector IpaB secretado tem como alvo a proteína deficiente em decomposição mitótica 2 (MAD2L2), bloqueando a maturação celular e levando a sobrevivência da célula mesmo infectada (IWAI et al., 2006). A inibição da morte celular e desprendimento são induzidas pela atividade de IpgD e OspE, respectivamente (PENDARIES et al., 2006; KIM et al., 2009). As funções secretoras celulares, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, são bloqueadas pela interrupção do tráfego Complexo de Golgi e Reticulo Endoplasmático-Complexo de Golgi através da ativação de efetores multifuncionais IpaB e VirA, respectivamente (MOUNIER et al., 2012; DONG et al., 2012).

No cromossomo de *Shigella* existem várias ilhas de patogenicidade designadas como SHI-1/SHE, SHI-2, SHI-3, SHI-O e SRL. Dentro destas ilhas encontram-se genes codificando fatores de virulência, incluindo autotransportadores (genes *pic* e *sigA*), fatores envolvidos na aquisição de ferro (*iucA,B,C,D* e *iutA*), na conversão de antígenos-O, na resistência antimicrobiana e na produção de enterotoxina ShET1 (HAZEN et al., 2016). Estudos genômicos de Hazen e colaboradores (2016), baseados em genes de virulência de EIEC, identificaram que os genes das ilhas de patogenicidade do cromossomo de *Shigella* são geneticamente semelhantes aos genes encontrados nas ilhas do cromossomo de EIEC.

A diarreia aquosa observada na Shiglose é atribuída às enterotoxinas 1 e 2 (ShET1 e ShET2). A ShET1 é codificada na ilha de patogenicidade SHI-1 do cromossomo e acredita-se ser limitada a *Shigella flexneri*, enquanto a ShET2 é codificada no plasmídeo de virulência e tem sido encontrada em todos os sorogrupos de *Shigella* e em EIEC (CROXEN et al., 2013; LIMA et

al., 2015; THE et al., 2016). ShET2 também tem sido encontrada na indução da inflamação nas células epiteliais intestinais (FARFAN et al., 2011) (FIGURA 2).

Outros fatores de virulência enterotoxinogênicos são Pic, SepA e SigA que pertencem a família das Serina Protease Autotransportadores (SPATEs). Pic degrada a espessa camada de muco pela sua atividade mucinolítica aumentando a chance dos patógenos ingressarem no epitélio intestinal (GUTIERREZ-JIMENEZ et al., 2008). Estudo observou que SepA, codificada no plasmídeo de virulência, leva à secreção de fluidos em *Shigella flexneri* 5a (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1995). SigA induz atividade enterotóxica similar a ShET1 (AL-HASANI et al., 2000) e pode ter efeitos citopáticos que desestabilizam a barreira epitelial (AL-HASANI et al., 2009) (FIGURA 2).

Outra toxina denominada Stx, mais comumente detectada em *Shigella dysenteriae* 1, está associado a severas e letais complicações. Além de inibir a síntese de proteínas do hospedeiro pela inativação dos ribossomos, essa enterotoxina pode ainda induzir a apoptose de vários tipos celulares, podendo levar a desenvolvimento de lesões vasculares no cólon, rim e sistema nervoso central (SCHROEDER; HILBI, 2008; LIMA et al., 2015; CROXEN et al., 2013).

Os mecanismos de patogenicidade deste patótipo são complexos e ainda pouco estudados. A avaliação dos genes codificadores de virulência tem suma importância no entendimento desta patogenicidade, mas ainda é escassa. Nosso estudo propôs um amplo e inédito painel de detecção dos genes de virulência mais indicados na literatura a fim de contribuir para o entendimento do impacto dos genes de virulência associados a patobiologia da infecção entérica pela *Shigella*/EIEC.

1.2.5 Diagnóstico laboratorial

A técnica em meios de cultura ainda é considerada o "padrão ouro" para o isolamento de cepas bacterianas, porém os resultados obtidos nestes ensaios podem ser influenciados por muitos fatores, tais como a carga bacteriana na amostra analisada, a experiência de quem está realizando o ensaio e as diversas habilidades para diferentes meios e protocolos (GUAN et al., 2016).

O uso de métodos moleculares, em particular a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), para o diagnóstico de patógenos entéricos em amostras fecais é indicado devido a maior sensibilidade em relação aos métodos microscópicos ou fenotípicos convencionais de detecção

(FRICKMAN et al., 2015). Estudos foram feitos comparando ensaios moleculares e microbiológicos convencionais nas mesmas amostras e obtiveram aumento significativo de positividade na detecção pelos métodos moleculares (OPERARIO E HOUPPT, 2011; BUCHAN et al., 2013; LINDSAY et al., 2013; LIU et al., 2016; LIU et al., 2017)

A maioria dos ensaios moleculares para o diagnóstico de *Shigella*/EIEC são baseados na amplificação de fragmentos de DNA do plasmídeo de invasão 220-kbp (*pinv*). Este plasmídeo pode ser espontaneamente perdido durante o crescimento do patógeno fora do hospedeiro, então os protocolos de PCR utilizam para a detecção destes patógenos primers direcionados contra o antígeno do plasmídeo de invasão (*ipaH*), o qual está presente em múltiplas cópias de genomas de *Shigella* e EIEC (BINET et al., 2014). Liu e colaboradores (2016) realizaram uma reanálise de amostras do projeto multicêntrico GEMS por qPCR, que antes tinham sido analisadas apenas por detecção em meios de cultura, e observaram um aumento no número de amostras positivas para *Shigella*/EIEC pelo método molecular, principalmente nas amostras de crianças de 12 a 23 meses de idade. Em estudo recente, esse grupo de pesquisa analisou, por sequenciamento metagenômico, as amostras do estudo GEMS anteriormente positivas para *Shigella*/EIEC por PCR em tempo real, alcançando a confirmação dos resultados anteriores (LIU et al., 2017).

O diagnóstico de *Shigella*/EIEC feito por PCR convencional é válido diante de amostras de DNA fecal de crianças a fim de prover amostras mais específicas para a detecção de genes codificadores de virulência pelo mesmo método.

1.3 Manifestações clínicas e complicações da infecção por *Shigella*/EIEC

A infecção por *Shigella* e EIEC, classicamente denominada Shigelose, caracteriza-se por ser uma infecção intestinal aguda com sinais clínicos que vão desde diarreia leve até uma severa disenteria com fortes dores abdominais, febre e fezes contendo muco e sangue (SCHROEDER; HILBI, 2008; ANGELINNI, 2009). A apresentação clínica, progressão e complicações variam dependendo do agente infeccioso, da imunidade do hospedeiro e dos efeitos do tratamento (CROXEN et al., 2013). Normalmente a doença é revertida, mas em pacientes fortemente imunodeprimidos, pacientes de áreas menos desenvolvidas ou pacientes que não recebem um tratamento adequado, a doença pode levar a morte (SCHROEDER; HILBI, 2008; CROXEN et al., 2013).

O período de incubação da doença é de 1 a 7 dias, mas os sintomas geralmente ocorrem dentro de 3 dias. A transmissão da bactéria de pessoa a pessoa dá-se por via oral-fecal, sendo a maioria dos casos causados por ingestão de água ou alimentos contaminados (MAURELLI et al., 2013) O maior fator de contaminação é a falta de higiene dos manipuladores de alimentos e o segundo é a estocagem imprópria de alimentos que contribui para os surtos da doença (NYGREN et al., 2012).

Shigella spp. é a principal causa de disenteria no mundo, porém outros enteropatógenos também a causam (FERDOUS et al., 2014). Em um estudo caso-controle em crianças de comunidades do Paquistão que buscou comparar a diarreia causada por *Shigella* spp. com a causada por espécies de *Campylobacter* spp. (outra bactéria reconhecida pela associação com disenteria), a Shigelose foi detectada, mais frequentemente, em indivíduos com sintomas mais severos como dores abdominais e disenteria (SOOFI et al., 2011).

A presença de *Shigella* spp. já foi relatada em indivíduos assintomáticos, inclusive em crianças de comunidades da Índia. É sugerido que tais indivíduos são determinantes no ciclo de transmissão da doença (GHOSH et al., 2014). Em um estudo coorte no Peru que buscou investigar a associação de retardo no crescimento infantil com importantes patógenos bacterianos como *Shigella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. foi o único associado com redução de crescimento linear (LEE et al., 2014).

Estados de imunossupressão, como infecção pelo vírus do HIV e desnutrição, podem estar associados a uma infecção sistêmica de *Shigella* spp. Em estudo realizado na África do Sul, 429 casos de Shigelose sistêmica foram detectados entre os anos de 2003 e 2009, sendo *S. flexneri* 2a o sorotipo mais prevalente (30%). A presença da infecção por HIV foi associada a maior taxa de mortalidade (KEDDY et al., 2012).

As complicações da Shigelose podem incluir megacólon tóxico, perfuração intestinal, peritonite, hiponatremia, hipoglicemia, pneumonia, arite pós-reativa e Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS) (CROXEN et al., 2013; MATTOCK et al., 2017). Em estudo realizado em Bangladesh identificou-se reação leucemóide, síndrome hemolítica urêmica, hiponatremia severa e distúrbios neurológicos associados principalmente a *S. dysenteriae* tipo 1 (KHAN et al., 2013).

Apesar das similaridades fenotípicas e genotípicas, acredita-se que EIEC causa infecção com sintomatologia menos severa (DUPONT et al., 1971; BANDO et al., 2010; MORENO et al., 2012). No entanto, há falta de estudos adequados em animais que comprovem essa diferença

(FUNG et al., 2014), além da difícil diferenciação diagnóstica entre os patógenos o que leva a conclusões erradas sobre a clínica associada.

Uma das hipóteses para essa diferença no quadro clínico é a maior eficiência de *Shigella* em disseminar-se pelas células epiteliais comparada a EIEC (MORENO et al., 2009). Além disso, foi observado que os patógenos apresentam diferença na expressão dos genes codificadores de fatores de virulência, sendo que *Shigella* spp. apresentava maior nível de expressão e isso poderia levar a uma fraca capacidade de disseminação da EIEC que poderia explicar a sua infecção ser menos severa (UD-DIN et al., 2014).

Em relação a resposta imune relacionada às células dendríticas, a resposta imune inata após a infecção é preservada embora essas células falham ao inativar os linfócitos T (MORENO et al., 2012). E ainda, a EIEC mostra um efeito retardatório em matar culturas de macrófagos J774 em comparação a *Shigella* spp., o que explicaria a EIEC levar mais tempo para causar diarreia comparado a *Shigella* spp. (BANDO et al., 2010).

1.4 Tratamento e prevenção da Shigelose

As abordagens de intervenção existentes para a redução de morbidade e mortalidade devido às diarreias infecciosas são largamente conhecidas atualmente e bastante variadas, desde medidas que buscam prevenir ou tratar a doença, como uso de soro para reidratação oral, antimicrobianos, probióticos e vacinas, até medidas que visam modificar o ambiente ou o estado nutricional do indivíduo, como saneamento básico, hábitos de higiene, aleitamento materno e suplementação de nutrientes (DAS et al., 2014).

No contexto da Shigelose, antimicrobianos tem sido prescritos para pacientes com sintomas mais severos e com possibilidade de transmissão da infecção, a fim de reduzir a duração e a severidade da doença além de aumentar a excreção do patógeno e prevenir complicações que resultam em risco para a vida (SANGEETHA et al., 2014; KLONTZ et al., 2015). A OMS recomenda, para os casos de Shigelose diagnosticados clinicamente, o uso de ciprofloxacina como primeira linha de tratamento. O uso de outras fluoroquinolonas, da ceftriaxona ou da azitromicina é sugerido somente em casos de resistência (WHO, 2005). A Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) preconiza a azitromicina como droga de primeira escolha para o tratamento da Shigelose. Ceftriaxona, ácido nalidíxico e

ciprofloxacina são agentes alternativos, sendo este último reservado para pacientes com idade superior a 17 anos (GUARINO et al., 2008).

Ao contrário das demais organizações de saúde, o Ministério da Saúde Brasileiro recomenda a associação sulfametoxazol-trimetoprim como primeira opção no tratamento de casos severos de infecção por *Shigella* spp.. A prescrição de quinolonas é indicada em casos de resistência e contra-indicada para crianças e gestantes (BRASIL, 2010). Resultados obtidos em diferentes regiões do Brasil já permitem inferir que o uso de sulfametoxazol-trimetoprim para o tratamento empírico de pacientes com Shigelose não é adequado, em virtude das elevadas taxas de resistência a esta associação (LIMA et al., 1995; BASTOS; LOUREIRO, 2011; DE PAULA et al., 2010; DINIZ-SANTOS et al., 2005; NUNES et al., 2012; PEIRANO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Vários estudos têm avaliado o resultado de outras abordagens para o controle da Shigelose. Em relação a medidas preventivas, o aleitamento materno exclusivo mostrou-se protetor da diarreia causada por *Shigella* spp. em estudo multicêntrico caso-controle (LINDSAY et al., 2015). Em relação a medidas de saneamento básico e melhora na higiene pessoal, em estudo realizado na província de Jiangsu, a não lavagem de mãos antes do jantar e a falta de acesso a fontes seguras de água foram associadas à Shigelose (TANG et al., 2014).

A vacina para Shigelose é uma urgente necessidade, dada a sua severidade clínica e alta prevalência em crianças abaixo de cinco anos de idade em países em desenvolvimento, no entanto uma vacina segura e eficaz ainda não está disponível (KOTLOFF et al., 2017). As vacinas de oligossacarídeos conjugados, intactos, inativados *whole-cells* e atenuados são candidatas com potencial de estimular uma resposta imune abrangente (KAMINSKI et al., 2017). No entanto, resta saber se alguma destas vacinas poderá proporcionar proteção cruzada tanto para *Shigella* como para EIEC (MAURELLI et al., 2013)

Vacinas contra *Shigella* e *Escherichia coli* enterotoxinogênica (ETEC) tem sido estudadas com potencial impacto na mortalidade da diarreia, visto que ambos patógenos tem importante impacto na causa da diarreia e nas consequências a longo prazo da doença (HOSANGADI et al., 2017). Estudos, ainda não publicados, provenientes da análise da população do estudo multicêntrico MAL-ED, sugerem que uma vacina contra ambos os patógenos poderia reduzir 2 dos 5 principais patógenos associados a diarreia e, aproximadamente, 43,4% de episódios por ano de diarreia nas crianças. Além disso, estes estudos, abordam que uma vacina eficiente contra

Shigella poderia, somado a redução nos casos de diarreia, poderia amenizar o prejuízo no crescimento.

Um estudo de revisão, publicado por Walker e colaboradores (2017), relatou as abordagens discutidas sobre as análises de vacinas para *Shigella* e ETEC na conferência Vaccines Against *Shigella* and Enterotoxigen *Escherichia coli* (VASE) ocorrida em Washington, Estados Unidos, em 2016. Segundo os autores, análises iniciais com o uso de uma vacina contra estes patógenos preveem que, até 2030, 150 mil mortes por diarreia poderiam ser evitadas globalmente, com a maioria deste impacto em países africanos (105 mil mortes evitadas). Além disso, a vacina pode evitar mais de 111 milhões de casos de diarreia moderada a severa que geram mais de 15 milhões de casos de anos de vida perdidos por incapacidade (WALKER et al., 2017). Portanto, avanços no entendimento da patogênese de *Shigella*/EIEC, incluindo a identificação de novos genes de virulência somados aqueles já presentes na literatura, podem ajudar no desenvolvimento de vacinas eficazes contra o patótipo (BARRY et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Episódios de diarreia na comunidade, mesmo aqueles não severos, são motivo de grande preocupação para a saúde pública devido à sua alta prevalência e à associação com prejuízo no crescimento, desenvolvimento cognitivo comprometido, enteropatia ambiental e até mesmo com mortalidade (LIMA et al., 2000; LEE et al., 2012; KOSEK et al., 2017). Devido a importância da infecção causada pelo patótipo *Shigella*/EIEC na diarreia infantil, o estudo deste patótipo pode contribuir com a redução dos índices de mortalidade e morbidade por diarreia infantil.

O presente estudo buscou desenvolver um amplo e inédito painel de detecção de genes codificadores de fatores de virulência do patótipo *Shigella*/EIEC, a fim de caracterizar a prevalência e a associação destes genes com sintomas clínicos. O estudo da detecção dos genes codificadores de fatores de virulência em amostras clínicas pode auxiliar no entendimento da patogenicidade da doença, dos sinais e sintomas e de possíveis alvos terapêuticos (MEDEIROS et al., 2017).

Além disso, avaliou-se a presença de copatógenos associados a infecção pelo patótipo. Com isso, buscou-se caracterizar o impacto de co-infecções na gravidade da infecção por *Shigella*/EIEC.

Até então, tais dados são escassos em regiões com alta mortalidade infantil, como a região do Semiárido Brasileiro em que há falta de saneamento básico, baixo poder aquisitivo das

famílias e baixo nível educacional dos pais das crianças (LIMA et al., 1992; MENDES et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar PCR para detecção dos genes de virulência, manifestações clínicas associadas e os copatógenos em crianças positivas para *Shigella*/EIEC de um estudo caso-controle no semiárido brasileiro.

3.2 Objetivos Primários

- Detectar *Shigella*/EIEC em amostras fecais de crianças com e sem diarreia utilizando PCR convencional;
- Desenvolver *primers* de genes codificadores de virulência para caracterização genética da *Shigella*/EIEC utilizando PCR múltiplas;
- Analisar a distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência relacionados à severidade da infecção pelo patotipo *Shigella*/EIEC diagnosticado em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no semiárido brasileiro;

3.3 Objetivos Secundários

- Caracterizar a distribuição dos determinantes populacionais, antropométricos, socioeconômicos, sanitários e clínicos na infecção por *Shigella*/EIEC em crianças provenientes no semiárido brasileiro.
- Avaliar a prevalência e sintomas associados as coinfeções do patotipo *Shigella*/EIEC com outros enteropatógenos em amostras fecais de crianças provenientes no semiárido brasileiro;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

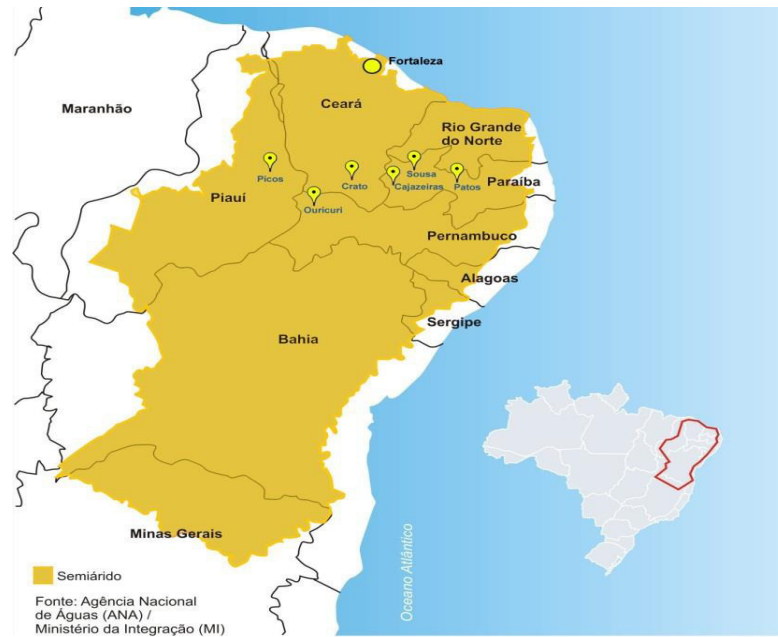
Esse estudo fez parte de um projeto intitulado “Intervenção com micronutrientes e impactos ao longo prazo no Brasil – Sub-projeto 2A” (Rede de Ovino Caprino Cultura e Diarreia Infantil no Semiárido Brasileiro - RECODISA), aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE/UFC) com o ofício nº338/2009, protocolo nº238/05, em 19 de novembro de 2009, após atendimento das recomendações exigidas (ANEXOS A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi revisado e aprovado pelo COMEPE/UFC (ANEXO B).

4.2 Delineamento e local do estudo

O RECODISA foi um estudo epidemiológico, observacional, analítico, caso/controle, realizado durante um período de 19 meses, de Setembro de 2009 a Março de 2011. A coleta de dados epidemiológicos e amostras de fezes foi realizada entre os meses de novembro de 2010 a Março de 2011: período de chuva e com maior incidência de casos diarreicos. O estudo foi realizado em seis cidades que representaram a região do Semiárido Brasileiro: Crato (Ceará), Picos (Piauí), Ouricuri (Pernambuco), Cajazeira (Paraíba), Souza (Paraíba) e Patos (Paraíba) (FIGURA 3). As seis cidades foram escolhidas para representar as cidades do Semiárido brasileiro, com base no tamanho populacional e na distância à Fortaleza.

O RECODISA foi composto de uma população de 1200 crianças (200 crianças por cidade participante) na faixa etária entre 2-36 meses, onde 596 foram incluídas no grupo caso e 604 no grupo controle. Os critérios de inclusão das crianças no grupo caso foram: apresentar três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 horas; não ter recebido cuidados médicos por mais de 12 horas; não ter sido transferida de outro hospital; ter consentimento dos pais ou responsáveis. Os critérios de inclusão no grupo controle foram: não ter apresentado diarreia nos últimos 14 dias; ter consentimento dos pais ou responsáveis.

Figura 3 – Região do Semiárido brasileiro e as cidades envolvidas no estudo



Fonte: SSGD – UPC-IBIMED

A figura 3 indica, em amarelo escuro, a delimitação da área que abrange a região do Semiárido brasileiro incluindo as seis cidades escolhidas para a coleta de amostra das crianças do estudo caso-controle RECODISA: Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeiras (PB), Souza (PB) e Patos (PB).

Após entrevista com os participantes, foram realizados a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) e o preenchimento do formulário epidemiológica e de dados antropométricos (ANEXO C) pelo responsável da criança. Os responsáveis receberam um pote de plástico estéril e foram orientados sobre o procedimento de coleta. As amostras coletadas foram armazenadas e enviadas em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Unidade de Pesquisas Clínicas/ Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC). As amostras fecais encontram-se armazenadas no LDI em freezers a -80°C para estudos posteriores. O presente estudo caracteriza-se como descritivo, caso-controle e foi realizado no LDI em colaboração internacional com a University of Virginia nos Estados Unidos.

4.3 Obtenção das amostras

O desenvolvimento de sondas moleculares e a aplicação da técnica pelo sistema Luminex Bio-Plex[®] 200 (Bio-Rad, California, EUA) permitiu detectar com alta sensibilidade um completo

painel de patógenos bacterianos (*Escherichia coli* patogênicas, *Shigella*/EIEC, *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio* sp. e *Campylobacter* sp.), protozoários (*Giardia* sp., *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* sp.) e vírus (rotavírus, sapovírus, norovírus e astrovírus) em DNA proveniente de amostras fecais das 1200 crianças do RECODISA (Tabela 1).

Tabela 1 – Patógenos, genes alvos, primers e probers e condições de PCR

Patógenos	Gene alvo (No. de acesso)		Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento	Referência
Bactérias					
<i>EAECC</i>	<i>aaiC</i> - ilha ativada por <i>aggR</i> (FN5547661)	F	ATTGTCCTCAGGCATTTCAC	30s a 94°C	(1)
		R	ACGACACCCCTGATAAACAA	30s a 60°C	(1)
		P	GTAGTGCATACTCATCATTTAAG	60s a 72°C	(1)
<i>EAECC</i>	<i>aata</i> - transportador de proteína anti- agregação (AY351860)	F	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	30 s a 94°C	(1)
		R	TTTTGCTTCATAAGCCGATAGA	30 s a 60°C	(1)
		P	TGGTTCTCATCTATTACAGACAGC	60s a 72°C	(1)
<i>EHECC</i>	<i>stx1</i> - <i>Shiga</i> toxina 2 (AE0051742)	F	ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG	30 s a 94°C	(1)
		R	ACAAATTATCCCCTGAGCCACTATC	30 s a 60°C	(1)
		P	CTCTGCAATAGGTACTCCA	60s a 72°C	(1)
<i>EHECC</i>	<i>stx2</i> - <i>Shiga</i> toxina 2 (AE0051742)	F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	30 s a 94°C	(1)
		R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	30 s a 60°C	(1)
		P	GGGGAGAATATCCTTTAATA	60s a 72°C	(1)
<i>EHECC/EPECC</i>	<i>eaeA</i> - Intimina proteína aderência (NC0116011)	F	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	30 s a 94°C	(1)
		R	CAAAGCGCACAAAGAYTACCA	30 s a 60°C	(1)
		P	GCACATAAGCAGGCAAAATAGC	60s a 72°C	(1)
<i>EPECC</i>	<i>bfpA</i> - gene estrutural pilus (pilina tipo 4) (NC0116011)	F	GGAAGTCAAATTCATGGGGG	30 s a 94°C	(1)
		R	GGAATCAGACGCAGACTGGT	30 s a 60°C	(1)
		P	GCTGCAACCGTTACCGCAGG	60s a 72°C	(1)

<i>ETEC</i>	<i>eltB</i> – subunidade enterotoxin B (NC0176331)	F	TTCCCACCGGATCACCAA	30 s a 94° C	(1)
		R	CAACCTTGTGGTGCATGATGA	30 s a 60° C	(1)
		P	CTTGGAGAGAAGAACCCT	60s a 72° C	(1)
<i>ETEC</i>	<i>estA</i> – enterotoxina estável ao calor (NC0176331)	F	GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA	30 s a 94° C	(1)
		R	CCCGGTACARGCAGGATTACAACA	30 s a 60° C	(1)
		P	TGGTCCTGAAAGCATGAA	60s a 72° C	(1)
<i>Shigella</i> spp./ EIEC	<i>ipaH</i> - antígeno plasmidial de invasão (M32063)	F	CGGAATCCGGAGGTATTGC	30 s a 95° C	(2)
		R	CCTTTTCCGCGTTCCTTGA	30 s a 60° C	(2)
		P	CGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCA	60s a 72° C	(2)
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>aerA</i> - aerolisina codificada por plasmideo (M16495)	F	TYCGYTACCAGTGGGACAAG	30 s a 95° C	(2)
		R	CCRGCAAACCTGGCTCTCG	30 s a 60° C	(2)
		P	CAGTTCAGTCCCACCACTT	60s a 72° C	(2)
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i>	<i>cadF</i> - <i>Campylobacter</i> adesão a fibronectina (AF104303)	F	CTGCTAAACCATAGAAATAAAATTTCTCAC	30 s a 95° C	(2)
		R	CCTTGAAGGTAATTTAGATATGGATAATCG	30 s a 60° C	(2)
		P	CATTTTGACGATTTTTGGCTTGA	60s a 72° C	(2)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> – <i>Salmonella</i> gene de invasão (M90846)	F	TCGGGCAATTCGTTATTGG	30 s a 95° C	(2)
		R	GATAAACTGGACCACGGTGACA	30 s a 60° C	(2)
		P	GAAGACAACAAAACCCACCGCC	60s a 72° C	(2)
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>toxR</i> - ativador transcricional da Colera (M21249)	F	GTTTGGCGWGAGCAAGGTTT	30 s a 95° C	(2)
		R	TCTCTTCTTCAACCGTTTCCA	30 s a 60° C	(2)
		P	CGCAGAGTMGAAATGGCTTGG	60s a 72° C	(2)
Parasitas					
<i>Cryptosporidiu</i>	<i>COWP</i> - <i>Cryptosporidium</i>	F	CAAATTGATACCGTTTTGTCCTTCTG	30 s a 95° C	(3)

<i>m</i> spp.	proteína 1 (AF279916)	R	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT	30 s a 55° C	(3)
		P	TGCCATACATTGTTGTCCTGACAAATT GAAT	30s a 72° C	(3)
<i>Entamoeba histolytica</i>	18S rRNA- 18S ribossomo RNA (X641142)	F	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTA AAA	30 s a 95° C	(3)
		R	CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT	30 s a 55° C	(3)
		P	ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATTCA	30s a 72° C	(3)
<i>Giardia lamblia</i>	18S rRNA- 18S ribossomo RNA (M54878)	F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	30 s a 95° C	(3)
		R	TTGCCAGCGGTGTCCG	30 s a 55° C	(3)
		P	CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG	30s a 72° C	(3)
Extrinsic control (Phocine Herpes Virus)	<i>gB^o</i> - Glicoproteína B 16 (Z68147)	F	GCGGTTCCAAACGTACCAA	30 s a 94° C 30 s a 95° C	(1,2,3)
		R	GGGCGAATCACAGATTGAATC	30 s a 60° C 30 s a 55° C	(1,2,3)
		P	TATGTGTCCGCCACCATCTG	60s a 72° C 30s a 72° C	(1,2,3)
<i>Virus Panel</i>					
Adenovirus	<i>Hexon</i> - proteína do capesídeo (L19443 and M21163)	F	GCCACRGTGGGRTTCTCAACTT	30 s a 94° C	(4)
		R	GCCGCAATGGTCTTACATGCACATC	30 s a 60° C	(4)
		P	TGCACCAGGCCCGGGCTCAG	60s a 72° C	(4)
Astrovirus	Capesídeo (AY720892)	F	CAGTTGCTTGCTGCGTTCA	30 s a 94° C	(4)
		R	CTTGCTAGCCATCACACTTCT	30 s a 60° C	(4)
		P	CACAGAAGAGCAACTCCATCGC	60s a 72° C	(4)
Norovirus GII	ORF1-ORF2 – Open reading frame 1 e 2 (AF145896)	F	CARGARBCNATGTTYAGR	30 s a 94° C	(4)
		R	TGGATGAGTCGACGCCATCTTCATTC ACA	30 s a 60° C	(4)

		P	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	60s a 72° C	(4)
Rotavirus	NSP3- proteína 3 (X81436)	F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	30 s a 94° C	(4)
		R	GGTCACATAACGCCCTATAGC	30 s a 60° C	(4)
		P	AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA	60s a 72° C	(4)
Saprovirus	RdRp-capsideo (AY237420, U73124 e AY646856)	F1	GAYCAGGCTCTCGCYACCTAC	30 s a 94° C	(4)
		F2	TTGGCCCTCGCCACCTAC	30 s a 60° C	(4)
		R 1	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	60s a 72° C	(4)
		R 2	CCCTCCATYTCAAACACTA		(4)
		P1	CYTGGTTCATAGGTGGTRCAG		(4)
		P2	CAGCTGGTACATTGGTGGCAC		
Extrinsic control	MS2g1- Bacteriófago MS2 (AY237420)	F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCAC	30 s a 94° C	(4)
		R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	30 s a 60° C	(4)
		P	CACATCGATAGATCAAGGTGCC	60s a 72° C	(4)

Fonte: SSGD – UPC/IBIMED

Legenda: (1) Taniuchi et al., 2013; (2) Liu et al., 2012; (3) Taniuchi et al., 2011; (4) Liu et al., 2011

Esta análise com Luminex serviu como primeiro diagnóstico, triagem e ponto de partida para o presente estudo, tendo como resultado a detecção de DNA fecal de *Shigella*/EIEC em 12,33% (148/1200) das amostras fecais das crianças do estudo RECODISA.

4.4 Extração de DNA fecal

As 148 amostras fecais, previamente positivas para *Shigella*/EIEC, que estavam armazenadas em freezers a – 80 °C, tiveram seu DNA fecal reextraído para o presente estudo utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante.

Aproximadamente 200 mg de fezes de cada amostra foram incubadas com 1 mL de tampão (*Innibitex* + PHhV + MS2). A mistura foi agitada fortemente por 1 minuto em homogeneizador até que as amostras estivessem totalmente homogeneizadas. A mistura foi

incubada por 5 minutos a 95 °C. O lisado foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado por 1 minuto para precipitação das partículas fecais.

Em seguida, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2 mL contendo 25 µL de proteinase K. A esse tubo foi também adicionado 600 µL de tampão AL (tampão constituído de hidrocloreto de guanidina). Os tubos foram então agitados no homogeneizador por 15 segundos, incubados a 70°C por 10 minutos e centrifugados por 1 minuto. Para completar o passo de desnaturação proteica, adicionou-se 600 µL a cada tubo de amostra e a mistura foi novamente centrifugada por 1 minuto.

Após breve centrifugação, a mistura foi transferida para um novo tubo contendo um filtro composto de uma membrana de sílica-gel. O DNA foi adsorvido à membrana durante uma rápida centrifugação (30 segundos). O filtro e o DNA foram transferidos para um novo tubo coletor, sendo o filtrado descartado. O DNA adsorvido foi, então, lavado em dois passos de centrifugação.

No primeiro deles, 500 µL do tampão AW1 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação por 1 minuto. A membrana ligada ao DNA foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado.

Na segunda lavagem, 500 µL do tampão AW2 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação por 3 minutos. Para que nenhum excesso de tampão permanecesse na amostra antes da eluição final, o filtrado foi descartado e o filtro foi colocado de volta ao mesmo tubo coletor e submetido a uma nova centrifugação de 1 minuto. A membrana contendo o DNA concentrado e purificado foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se, então, 200 µL do tampão de eluição AE e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente. A centrifugação durante 1 minuto completou o processo. A presença de DNA foi confirmada e quantificada no produto de extração de cada amostra por medidas de absorbância em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA).

O DNA obtido foi armazenado a -20°C em duas alíquotas contendo 100 µL cada uma para posterior análise. Todas as centrifugações foram realizadas a 10.000xg à temperatura ambiente.

4.5 Detecção molecular de *Shigella*/EIEC

O diagnóstico de *Shigella*/EIEC escolhido para o presente estudo foi realizado pela detecção, no DNA fecal extraído das 148 amostras fecais, do gene codificador do antígeno plasmidial de invasão (*ipaH*) a partir de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) única, utilizando o kit GoTaqGreen (Promega, São Paulo, Brasil). Este diagnóstico foi escolhido a fim de prover amostras essencialmente positivas para a PCR que seriam mais específicas para a detecção dos genes de virulência pela mesma técnica.

O par de iniciadores foram utilizados em concentração de 0,2 μ M e as reações seguiram o seguinte protocolo: 1) 95°C por 5 minutos; 2) 40 ciclos de: a) desnaturação (95°C por 30 segundos), b) anelamento (60 °C por 30 segundos) e c) extensão (72 °C por 1 minuto); 3) 72°C por 10 minutos em termociclador MyCycler (Bio-rad, Estados Unidos). Os iniciadores foram obtidos do estudo de Luscher e Altwegg (1994), os quais foram desenhados baseados em sequências do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) presentes em *Shigella* e EIEC (TABELA 1). Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados (*ChemiDoc XRS*, *Bio-Rad Laboratories*, *Hercules*, *CA*) após eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração com Brometo de Etídio. O DNA da cepa *Shigella flexneri 2a 301* foi utilizado como controle positivo e a água MilliQ como controle negativo.

Tabela 2 – Descrição do gene, sequência de iniciadores, número de acesso ao GenBank, tamanho do produto amplificado e condições de reação da PCR única para o diagnóstico de *Shigella*/EIEC

Gene	Sequência de iniciadores (5' - 3')	Acesso ao GenBank, NCBI	Produto (pb)	Condições dos ciclos	Referência
<i>ipaH</i>	F:TGGAAAACTCAGTGCCT CT R:CAGTCCGTAAATTCATTCT	HE616529.1	422	40 ciclos: 30'' a 95°C, 30'' a 60° C, 60'' a 72 °C	Luscher e Altwegg, 1994

Fonte: elaborada pela própria autora.

4.6 Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência

As amostras de DNA fecal detectadas como *Shigella*/EIEC foram analisadas por reações de PCR múltiplas para investigação de 28 genes de virulência (TABELA 3). Estes genes estão relacionados a codificação de fatores de virulência, tais como: toxinas (*stx*, *set*, *sen*); proteases (*pic*, *sigA*, *sepA*), captadores de ferro (*iutA*, *iucB*), imunomodulador (*shiA*), efetores do T3SS

(*ipaABCD*, *ipgB1*, *ipgB2*, *ipaH7.8*, *ipaH9.8*, *ipgD*, *virA*, *icsB*, *ospF*, *ospB*, *ospC1*, *ospG*), autotransportador (*icsA*), reguladores (*virB*, *virF*) e antígeno de invasão (*ial*).

As reações de PCR incluíram 3 painéis (A, B e C) utilizados em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (MEDEIROS et al., 2017) e mais 4 painéis (D, E, F e G) propostos no presente estudo (TABELA 2). Isolados de *S. flexneri*, *Escherichia coli* enteroagregativa cepa H223-1 e *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 foram utilizados como controles positivos, enquanto que água *MilliQ* autoclavada serviu como controle negativo. Cada reação foi padronizada com o uso de controles positivos para determinar as condições de PCR mais eficientes, de forma a reduzir a existência de bandas inespecíficas e facilitar a interpretação dos resultados. Tais condições incluíram a melhor temperatura de anelamento (T_a), o número de ciclos e a concentração dos iniciadores. Os iniciadores foram desenhados baseado em sequências presentes no genoma de EIEC e *Shigella* utilizando a ferramenta OligoPerfect™ Designer (Thermo Fischer Scientific) e, então, sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil). Tais iniciadores e suas temperaturas de ciclagem encontram-se na (TABELA 3). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio para visualização e fotodocumentação sob luz ultravioleta (UV).

Tabela 3 - Descrição dos genes alvos, sequência dos iniciadores, número de acesso ao GenBank, tamanho dos produtos amplificados e condições das reações de PCR múltiplas para a pesquisa de genes de virulência de *Shigella*/EIEC

Genes alvo-funções	Sequência de iniciadores (5' - 3')	Acesso ao GenBank, NCBI	Amplicons (pb)	Condições dos ciclos	Referência
PAINEL A – MULTIPLEX 1					
<i>sen</i> – Enterotoxina 2	F: ATCTCCTTGAGGCCAGCAAA R:GGAAGGAATGGGAGGACGAA	Z54211.1	296		Medeiros et al., 2017
<i>sigA</i> – protease citotóxica semelhante a IgA	F: CCGACTTCTCACTTTCTCCCGCC R: ATCCAGCTGCATAGTGTTG	NC_004337	430		Boisen et al, 2009
<i>pic</i> – protease de atividade mucinolítica	F:ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT R:GACTTAATGTCACTGTTCAGCG	U35656.1	570	35 ciclos: 45'' a 94°C, 45'' a 58 °C, 60'' a 72 °C	Restieri et al., 2007
<i>sepA</i> - protease extracelular	F:GCAGTGGAAATATGATGCGGCTT R:GTTTCAGATCGGAGAAGAACG	Z48219.1	794		Restieri et al., 2007
PAINEL B – MULTIPLEX 2					
<i>icsA</i> – polimerização da actina	F: CCAACCCCTCTCATGCAT R: ATCACCAGCACCCACCATGAC	AF336770.1	83		Medeiros et al., 2017
<i>stx</i> – toxina Shiga	F: TTCTGGGAAGCGTGGCATTA R: CATCAGAATTGCCCCCAGAG	X07903.1	167		Medeiros et al., 2017
<i>icsB</i> - prevenção do reconhecimento autofágico	F: GGCCTGCATCAAGTCTTTCG R: GGCATCGGTACAGCCAAAAA	M86530.1	280	35 ciclos: 45'' a 94°C, 45'' a 60 °C, 60'' a 72 °C	Medeiros et al., 2017
<i>virB</i> - regulador de <i>ial</i>	F: CGCGCGAGACAGATTCTCTT R: TGGTGGATTTGTGCAACGAC	CP001384.1	488		Medeiros et al., 2017
PAINEL C – MULTIPLEX 2					

<i>ipaC</i> - Antígeno plasmidial de invasão C	F:CCTCACCACAACTAACTCTAGCA R:AGAAGTTTTATGTTTCAGTTGACAG GGATA	AF386526.1	93		Boisen et al., 2009
<i>ipaB</i> - Antígeno plasmidial de invasão B	F: CAAGCCCTGAATCCGATCAT R: TGCTGCTGCCTGTTTACCAA	X60777.1	204	35 ciclos: 45'' a	Medeiros et al., 2017
<i>ipaD</i> - Antígeno plasmidial de invasão D	F: AAGAAGCCGAGCTTGATGGAG R: CCTCGCCATTCCACCTAGA	AF386526.1	450	94°C, 45'' a 60 °C, 60'' a 72 °C	Medeiros et al., 2017
<i>ipaA</i> - Antígeno plasmidial de invasão A	F: CCTGTGTCCCCGAGAAAGAGA R: TGACGCACAGGCCAAAACCTTG	CP000039.1	628		Medeiros et al., 2017
PAINEL D – MULTIPLEX 2					
<i>ipgD</i> - converte PtdIns(4,5)P ₂ a PtdIns(5)P ₂	F: GAAACCGGAAAGCACAAAGG R: CTGTCACGCGCAAACAAAAG	AF386526.1	149	35 ciclos: 45'' a	Este estudo
<i>iucB</i> – síntese de aerobactina	F: CCTCCTGTTCTGCTTCACC R: TGACGGCCTTGTAAGCTCAA	AY277720.1	270	94°C, 45'' a 60 °C, 60'' a 72 °C	Este estudo
<i>iutA</i> - Receptor para o complexo sideróforo-ferro	F:AGTATATGCCCCGGGCTCTT R: CAATGCGCTCATCGTGATCT	AE005674.2	528		Este estudo
<i>virA</i> - Inibe mecanismo p53/NF-κB	F:AAGCCCTTCACTGCTTGGA R: ACTCACAAGCCTGCACCAGA	AF386526.1	702		Este estudo
PAINEL E – MULTIPLEX 2					
<i>ospB</i> - promove processo pro-inflamatório	F:TTCTTGGGCACGGTAGTCCT R: ACTTTCAGCAGGGGCATTGT	AF386526.1	185		Este estudo
<i>ospG</i> - inibe a ativação da NFκB	F:AGTAACGGAGCCCATTCTCG R: GCAGCATTCGGAGGTACACA	AF386526.1	230	35 ciclos: 45'' a	Este estudo
<i>ipaH7.8</i> - Promove a pirocitose do	F:ACCACGGCCCACAGATTTAC R: AAAGGCCTTCTGATGCCTGA	AF386526.1	387	94°C, 45'' a 60	Este estudo

macrófago				°C, 60'' a 72 °C	
<i>IpaH9.8</i>- inibe a ativação da NFκB	F:CTGCCAGCTTTACCCGATTC R: AAAGGCCTTCTGATGCCTGA	AF386526.1	691		Este estudo
PAINEL F – MULTIPLEX 2					
<i>ipgB2</i>- remodela a actina	F:CCGCTGTACAATGGGGAAAA R: TTGGTTTACCACCCGGGATA	AF386526.1	151		Este estudo
<i>ospF</i>- inativa MAPk	F:GCATCGAACGTGCCAACTTA R: CCCACACGAGATTGCTGAGA	AF386526.1	284	35 ciclos: 45'' a	Este estudo
<i>ipgB1</i>- remodela a actina	F:CCTCGCCCATCATTTGATTC R: TTTGCTCTGAGGCCAGATGA	AF386526.1	404	94°C, 45'' a 60 °C, 60'' a 72 °C	Este estudo
<i>ospC1</i>- promove processo pro-inflamatório	F:GATGCACCATCAGACGCTAAAG R: CAGATCCACAGGGGCAAGAT	AF386526.1	675		Este estudo
PAINEL G – MULTIPLEX 3					
<i>shiA</i>- reduz a resposta inflamatória	F:CTGTGTGGCATGACTTCTCC R: CAGGTGCTCCTGCTGTCTTA	AE005674.2	227	35 ciclos: 45'' a	Este estudo
<i>ial</i>- antígeno de invasão	F:CTGGATGGTATGGTGAGG R: GGAGGCCAACAATTATTTC	CP001384.1	320	94°C, 45'' a 57 °C, 60'' a 72 °C	Frankel et al., 1989
<i>set</i>- enterotoxina 1	F: TCCCTTCATACTGGCTCCTG R: AACACTCTGTGGGGGAACAG	Z47381.1	553		Farfan et al., 2010
<i>virF</i>- regulador de <i>virB</i>	F: AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC R: TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	AY206433.1	618		Vidal et al., 2005

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Avaliação dos dados clínicos, populacionais e antropométricos da população do estudo

As informações sobre manifestações clínicas (febre, vômito, dor abdominal e presença de sangue nas fezes), dados populacionais (sexo, idade, alimentação, renda mensal familiar, nível educacional materno, saneamento básico) e medidas antropométricas (peso, altura, circunferência da cabeça) foram coletadas a partir do formulário padronizado respondido pelos pais ou responsáveis pela criança.

Desidratação foi definida como moderada ou severa baseada no manual da OMS para tratamento da diarreia (WHO, 2005). Disenteria foi definida como a presença de sangue visível nas fezes reportado pelos pais ou responsáveis das crianças. Febre associada com diarreia foi definida quando a criança apresentava diarreia acompanhada de temperatura corporal maior que 37,5 °C e vômito associado a diarreia foi definido pela apresentação de vômito em algum ponto dos episódios diarreicos.

Os formulários foram levados à dupla digitação e gerenciamento de segurança e confiabilidade pelo Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), no Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro/Universidade Federal do Ceará (IBISAB/UFC).

4.8 Análise estatística dos dados

Todos os dados gerados foram digitados em planilha Excel MICROSOFT® (New York, NY, USA). Após padronização do banco de dados, o teste exato de Fischer foi empregado para comparar a ocorrência de um parâmetro (clínico, socioeconômico, antropométrico, ambiental) entre os grupos caso e controle, e também para a análise de copatógenos de *Shigella*/EIEC entre os grupos. O intervalo de confiança foi de 95% e o teste foi considerado significativo quando $P < 0,05$. Para análise descritiva foram utilizadas tabelas e figuras. A construção dos gráficos e testes estatísticos foram obtidos utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 5.01, San Diego, CA, USA). Utilizou-se o programa EpiInfo versão 6.0 (Center for Diseases Control, Atlanta, GA) para o cálculo dos escores-z a partir das medidas antropométricas.

Outra análise empregada neste estudo foi através do software CART® (Classification and Regression Trees) (Salford-Sytems, San Diego, CA, USA), que possibilita uma moderna classificação de dados baseado em árvores de decisão. Neste estudo, o CART pôde indicar associação de presença de genes de virulência ou de co-infecções com manifestações clínicas

adicionais a diarreia das crianças do grupo caso. Tendo em vista a existência de dados epidemiológicos neste trabalho, o CART foi determinante no desenvolvimento de resultados mais eficientes para este estudo.

5. RESULTADOS

5.1 Detecção molecular do patotipo *Shigella*/EIEC na população do estudo

A detecção do patotipo *Shigella*/EIEC entre as crianças do estudo foi de 40,5% (60/148), sendo 60% (42/70) em crianças do grupo caso e 23% (18/78) do grupo controle, com associação significativa da presença do patotipo em crianças com diarreia ($p < 0,0001$, OR = 5, IC95% 2,49 a 10,09, teste de Fischer) (TABELA 4).

Em relação à distribuição da prevalência do patotipo entre as cidades do estudo, a detecção do patotipo na cidade de Picos ($p = 0,0001$, OR = infinito, IC95% = 4,73 a infinito) foi associada significativamente ao grupo caso (TABELA 4).

Tabela 4 - Distribuição da detecção de *Shigella*/EIEC entre as cidades do estudo

Cidades do Estudo	Casos n = 70 (%)	Controles n = 78 (%)	Total n = 148 (%)	Valor P
Cajazeiras (PB)	3 (4,3%)	0 (0%)	3 (2%)	0,1034
Crato (CE)	11 (15,7%)	10 (12,8%)	21 (14,2%)	0,6441
Ouricuri (PE)	4 (5,7%)	5 (6,4%)	9 (6%)	0,9999

Patos (PB) 5 (7,14%) 1 (1,3%) 6 (4%) 0,1011

Picos (PI)	12 (17,1%)	(0%)	12 (8,1%)	0,0001
Sousa (PB)	7 (10%)	2 (2,6%)	9 (6%)	0,0850
Total	42 (60%)	18 (23%)	60 (40,5%)	0,0001

Fonte: Elaborada pela autora.

PB: Paraíba; CE: Ceará; PE: Pernambuco; PI: Piauí

5.2 Caracterização da população positiva para *Shigella*/EIEC quanto aos dados socioeconômicos, ambientais, antropométricos e clínicos

Das crianças diagnosticadas com o patotipo *Shigella*/EIEC, a maioria era do sexo masculino (61,3%, 37/60), estavam na faixa de idade de 12 a 24 meses (41,6%, 25/60) e tinham uma alimentação não mais baseada em amamentação (46,6%, 28/60) (TABELA 5).

Tabela 5 – Caracterização das crianças do estudo detectadas com o patotipo *Shigella*/EIEC quanto ao gênero, idade e alimentação

Parâmetros	Total n = 60 (%)
Sexo	
Masculino	37 (61,3%)
Feminino	23 (38,3%)
Idade (meses)	

2 – 6	2 (3,33%)
6 – 12	12 (20%)
12 – 24	25 (41,6%)
24 – 36	21 (35%)
Alimentação	
Só amamentação	0%
Amamentação não exclusiva	27 (45%)
Não mama mais	28 (46,6%)
Nunca mamou	5 (8,33%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto às famílias destas crianças, 89,9% (54/60) delas possuíam renda familiar de até 2 salários mínimos (R\$ 1090,00) da época do estudo, 94,9% (57/60) das mães das crianças tinham algum grau de ensino, mas nenhuma possuía ensino superior completo (TABELA 6). Em relação às condições de saneamento básico das casas onde habitavam as famílias, 56,7% (34/60) destas casas possuíam a fossa como tipo de esgoto sanitário e 88,3% (53/60) possuíam sanitário dentro de casa (TABELA 6).

Tabela 6 – Caracterização das famílias das crianças detectadas com o patótipo *Shigella*/EIEC quanto a renda familiar e ao grau de escolaridade das mães

Parâmetros	Total n = 60 (%)
Renda familiar (em salários mínimos)	
$\leq \frac{1}{2}$	7 (11,6%)
$\frac{1}{2} \text{ a } \leq 1$	23 (38,3%)
$1 \text{ a } \leq 2$	24 (40%)

2 a ≤ 3	3 (5%)
3 a ≤ 5	2 (3,33%)
≥ 5	1 (1,66%)
Grau de escolaridade da mãe	
Não estudou	3 (5%)
Primário incompleto	15 (25%)
Primário completo	9 (15%)
Secundário incompleto	19 (31,6%)
Secundário completo	11 (18,3%)
Superior incompleto	3 (5%)
Superior completo	0%
Tipo de esgoto sanitário	
Fossa	34 (56,7%)
Esgoto público	20 (33,3%)
Sem esgoto	6 (10%)
Há sanitário dentro da casa	
Sim	53 (88,3%)
Não	7 (11,7%)

Fonte: Elaborada pela autora.

As crianças diagnosticadas com o patotipo tiveram seus escores-Z calculados a partir de suas medidas antropométricas e os dados observados estão listados na Tabela 7. Não houveram diferenças significativas estatisticamente entre as crianças que apresentavam diarreia e as demais crianças, o que sugere que a presença do patotipo nos casos não causou alteração significativa nos parâmetros nutricionais avaliados.

Tabela 7 – Médias dos scores Z e das medidas antropométricas avaliadas das crianças com amostras positivas para *Shigella*/EIEC entre os grupos caso e controle

Medidas antropométricas	Caso (n=42)	Controle (n=18)	Total (n= 60)	Valor P
HAZ¹ (Média ± DP)	-0,7110±1,475	-0,5411±1,765	-0,6592±1,555	0,4672
WAZ² (Média ± DP)	-0,1310±1,417	-0,3722±1,408	-0,2046±1,406	0,6662

WHZ³ (Média ± DP)	0,3045±1,854	-0,0661±1,518	0,1933±1,755	0,9515
BAZ⁴ (Média ± DP)	0,4400±1,874	-0,0116±1,616	0,3045±1,799	0,8322
HCZ⁵ (Média ± DP)	0,4812±1,997	0,3544±1,132	0,4432±1,773	0,7622
Peso (kg; Média ± DP)	10,99±2,128	10,43±2,907	10,82±2,376	0,0877
Altura (cm; Média ± DP)	80,79±7,829	79,39±9,580	80,37±8,334	0,4658
Circunferência da cabeça (cm; Média ± DP)	47,33±2,160	46,83±2,895	47,18±2,390	0,6594

Fonte: Elaborada pela autora.

¹ Height-for-age z-scores (HAZ), ² weight-for-age z-scores (WAZ), ³ weight-for-height z score (WHZ), ⁴ BMI-for-age z-scores (BAZ) ⁵ head circumference Z-scores (HCZ).

As manifestações clínicas adicionais a diarreia das crianças do grupo caso, ou seja, aquelas que apresentavam diarreia na época da coleta da amostra e estavam infectadas pelo patotipo *Shigella/EIEC*, foram analisados e encontram-se no GRÁFICO 1.

Tabela 8 – Prevalência de manifestações clínicas adicionais a diarreia

Manifestações clínicas	Casos n= 42 (%)
Desidratação	20 (47,6%)
Febre	16 (38,1%)
Vômito	15 (35,7%)
Inquietação	15 (35,7%)
Fraqueza	14 (33,3%)
Dor abdominal	11 (26,2%)
Tosse ou outros sintomas respiratórios	10 (23,8%)
Fezes com muco	8 (19%)
Fezes com sangue	2 (4,76%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se baixa prevalência de sintomas clínicos entre as crianças infectadas. A maior prevalência foi observada para o dado clínico desidratação (47,8%, 20/42), seguida por vômito e inquietação (ambos 35,7%, 15/42) e a menor taxa foi observada para o dado clínico sangue nas fezes (4,76%, 2/42).

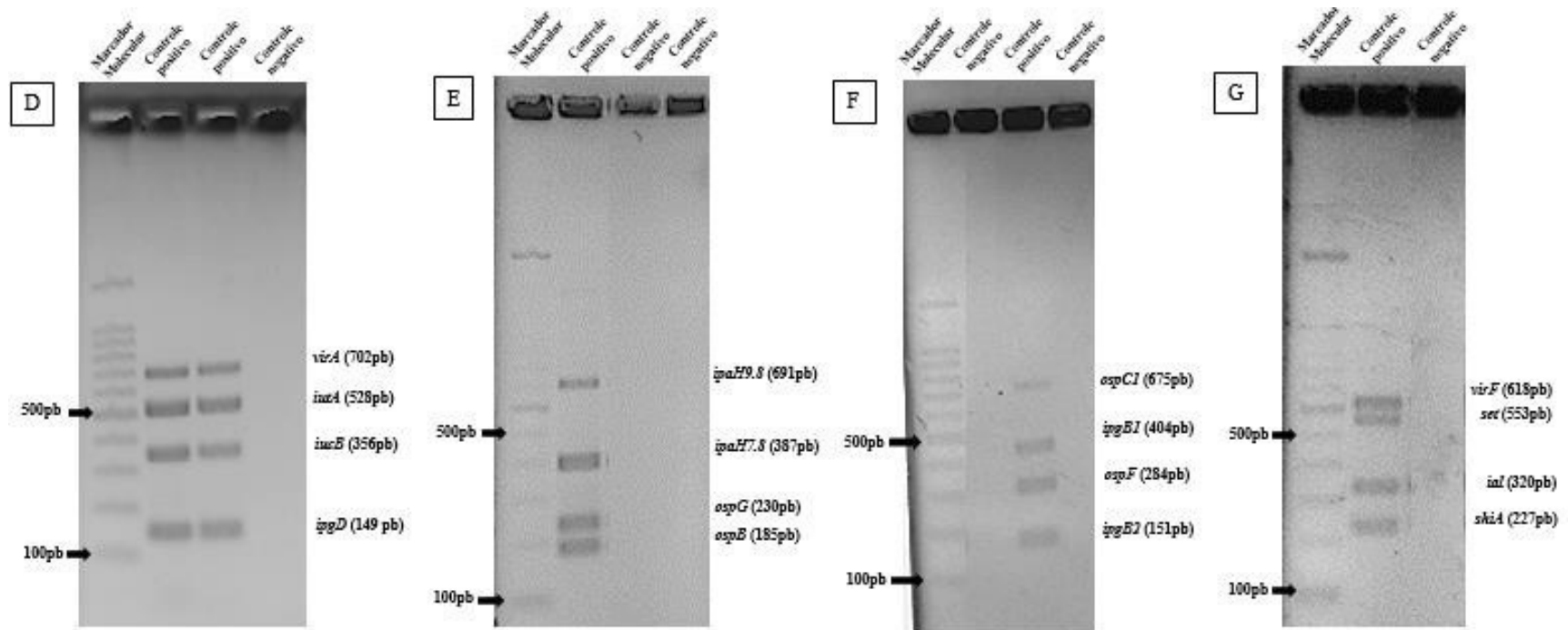
5.3 Desenvolvimento de reações de PCR multiplex para detecção de genes de virulência

Para o desenvolvimento das quatro novas reações de PCR múltiplas, os 16 pares de iniciadores específicos desenhados e sintetizados para cada gene-alvo foram testados previamente com seus respectivos controles positivos separadamente, mostrando especificidade, com bandas nítidas, previstas e amplificadas em protocolos viáveis e concentrações analisadas. Após esta etapa, uniram-se os iniciadores em grupo de reação, de acordo com a TABELA 3, para o desenvolvimento das reações múltiplas.

Após as fases de otimização e testes de temperaturas, as reações de PCR múltiplas seguiram o referido protocolo: 95°C a 15min; 35 ciclos de 94°C por 45s, Ta por 45s e 72°C por 1min; e 72°C por 10min. A Ta foi específica para cada reação de PCR múltipla, como mostrado na TABELA 3. Utilizaram-se iniciadores na concentração de 0,1µM e 0,5µM (esta última apenas para o iniciador referente ao gene *iutA*). A Figura 5 mostra a representação dos padrões das bandas de cada novo painel desenvolvido neste presente estudo. Foi utilizado marcador molecular de 100pb e o tamanho de cada banda está descrito na TABELA 3.

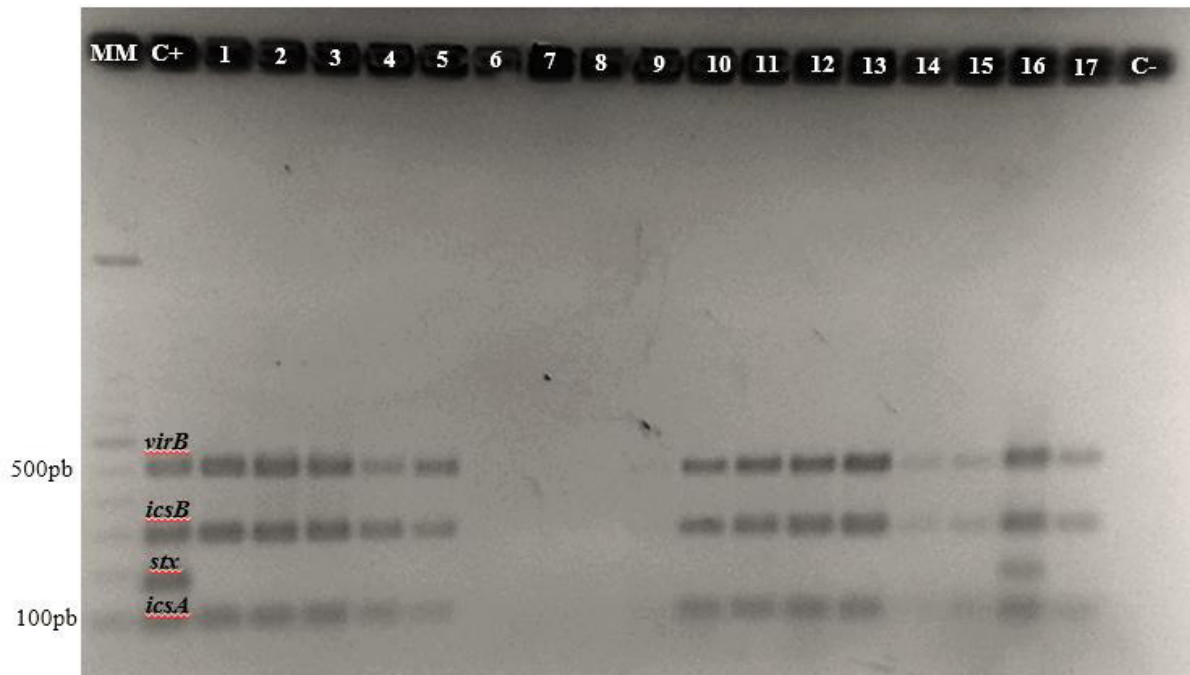
Após a padronização, a técnica foi utilizada para a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência nas amostras de DNA fecal do estudo. A FIGURA 6 mostra fotodocumentação de gel de agarose referente ao painel B realizado em amostras do estudo.

Figura 5 – Fotodocumentação dos géis de agarose a 2% com os produtos de PCR representativa dos testes de validação dos iniciadores para os painéis D, E, F, G e seus controles



A figura 7 indica o fotodocumentação dos géis de agarose dos quatro novos painéis de PCR múltiplas (D, E, F e G) propostos neste estudo para a detecção de genes de virulência. À esquerda de cada gel mostra-se o tamanho, em pares de bases, das bandas representativas do marcador molecular de 100pb e a direita mostra-se o tamanho das bandas representativas de cada gene constituintes de cada painel desenvolvido.

Figura 6 – Fotodocumentação do gel de agarose a 2% da PCR referente ao painel B em amostras do presente estudo



A figura 8 mostra a fotodocumentação dos produtos de PCR visualizados após a eletroforese referentes à detecção de genes de virulência do painel B nas amostras de DNA fecal do presente estudo. A primeira coluna refere-se ao marcador molecular, a segunda coluna ao controle positivo e a última coluna ao controle negativo. As demais colunas referem-se as amostras de DNA fecal do estudo. A sequência de colunas segue a seguinte ordem: MM = marcador molecular; C+ = controle positivo; 1 a 17 = amostras; C- = controle negativo.

5.4 Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência

Foram pesquisados ao todo 28 genes de virulência (TABELA 9) dos quais o mais prevalente foi o gene *iucB* (90%, 54/60), seguido pelo gene *iutA* (83,3%, 50/60), os dois são genes encontrados nas ilhas de patogenicidade do cromossomo do patotipo e responsáveis pela aquisição de ferro pela bactéria. As menores prevalências foram observadas para os genes *ipgD* (26,6%, 16/60), *ipaC* (21,6%, 13/60) e *stx* (1,67% 1/60). Os dois primeiros são genes codificadores de efetores do sistema T3SS e o último, gene codificador da toxina Shiga. O gene *stx* foi detectado apenas nas amostras das crianças assintomáticas, sem significado estatístico.

Os genes *sen* ($p = 0,0267$; OR = 4,25; IC95% = 1,27-14,15), *ipgB2* ($p = 0,0267$; OR = 4,25; IC95% = 1,27-14,15), *ospF* ($p = 0,0354$; OR = 3,66; IC95% = 1,12-11,9) e *ipgB1* ($p = 0,0354$; OR = 3,66; IC95% = 1,12-11,9) foram associados aos casos de diarreia.

Tabela 8 – Genes codificadores de fatores de virulência e suas distribuições entre os grupos caso e controle do estudo

Genes de virulência	Casos (n=42)	Controles (n=18)	Total (n=60)	Valor P	Odds Ratio	95% IC
<i>sen</i>	34 (80,9%)	9 (50%)	43 (71,6%)	0,0267*	4,25	1,27 – 14,15
<i>sigA</i>	31 (73,8%)	11 (61,1%)	42 (70%)	0,3669	1,79	0,55 – 5,87
<i>pic</i>	21 (50%)	9 (50%)	30 (50%)	1,0000	1,00	0,33 – 3,01
<i>sepA</i>	19 (45,2%)	7 (38,8%)	26 (43,3%)	0,7785	1,30	0,42 – 4,00
<i>icsA</i>	29 (69%)	10 (55,5%)	39 (65%)	1,0000	1,09	0,34 – 2,96
<i>stx</i>	0 (0%)	1 (5,5%)	1 (1,67%)	0,3000	0,13	0,005 – 3,55
<i>icsB</i>	31 (73,8%)	11 (61,1%)	42 (70%)	0,3669	1,79	0,55 – 5,87
<i>virB</i>	31 (73,8%)	11 (61,1%)	42 (70%)	0,3669	1,79	0,55 – 5,87
<i>ipaC</i>	12 (28,6%)	1 (5,5%)	13 (21,6%)	0,0841	6,80	0,81 – 56,9
<i>ipaB</i>	26 (61,9%)	8 (44,4%)	34 (56,7%)	0,2614	2,03	0,66 – 6,22
<i>ipaD</i>	17 (40,5%)	6 (33,3%)	23 (38,3%)	0,7734	1,36	0,43 – 4,33
<i>ipaA</i>	16 (38,1%)	2 (11,1%)	18 (30%)	0,0629	4,92	0,99 – 24,3
<i>ipgD</i>	12 (28,6%)	4 (22,2%)	16 (26,6%)	0,7549	1,40	0,38 – 5,12
<i>iucB</i>	40 (95,2%)	14 (77,7%)	54 (90%)	0,0602	5,71	0,94 – 34,7
<i>iutA</i>	38 (90,5%)	12 (66,6%)	50 (83,3%)	0,0524	4,75	1,14 – 19,7
<i>virA</i>	29 (69%)	8 (44,4%)	37 (61,6%)	0,0887	2,78	0,89 – 8,69
<i>ospB</i>	26 (61,9%)	8 (44,4%)	34 (56,6%)	0,2614	2,03	0,66 – 6,22
<i>ospG</i>	27 (64,3%)	10 (55,5%)	37 (61,6%)	0,5712	1,44	0,46 – 4,43
<i>ipaH7.8</i>	34 (81%)	10 (55,5%)	44 (73,3%)	0,0580	3,40	1,01 – 11,3
<i>ipaH9.8</i>	28 (66,6%)	8 (44,4%)	36 (60%)	0,1517	2,50	0,80 – 7,73
<i>ipgB2</i>	34 (80,9%)	9 (50%)	43 (71,6%)	0,0267*	4,25	1,27 – 14,1
<i>ospF</i>	33 (78,6%)	9 (50%)	42 (70%)	0,0354*	3,66	1,12 – 11,9

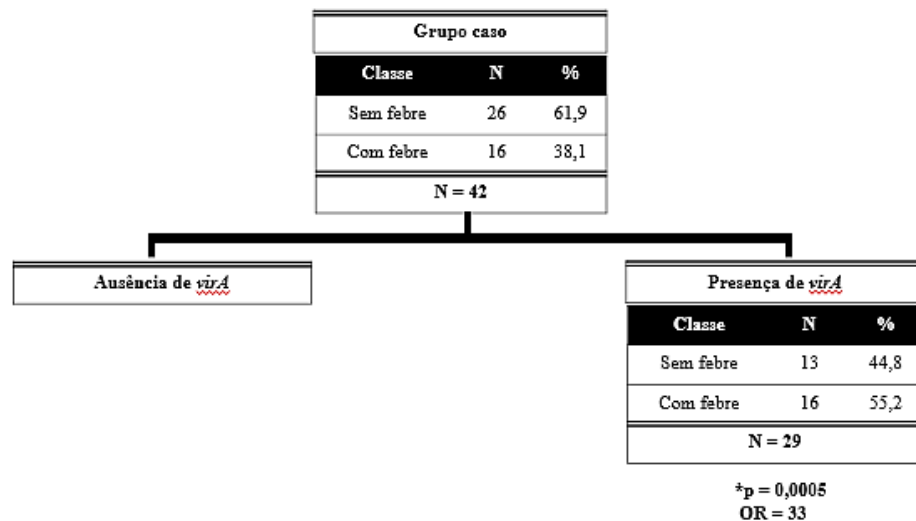
<i>ipgB1</i>	33 (78,6%)	9 (50%)	42 (70%)	0,0354*	3,66	1,12 – 11,9
<i>ospC1</i>	34 (80,9%)	10 (55,5%)	44 (73,3%)	0,0580	3,40	1,01 – 11,4
<i>shiA</i>	21 (50%)	7 (38,8%)	28 (46,6%)	0,5738	1,57	0,51 – 4,83
<i>ial</i>	33 (78,6%)	9 (50%)	42 (70%)	0,4047	1,73	0,58 – 5,13
<i>set</i>	24 (57,1%)	6 (33,3%)	30 (50%)	0,1581	2,66	0,84 – 8,46
<i>virF</i>	31 (73,8%)	9 (50%)	40 (66,6%)	0,1335	2,81	0,89 – 8,92

Fonte: Elaborada pela autora.

*valores de p significativos

Para a análise do agrupamento de genes de virulência pesquisados neste estudo com dados de sintomas clínicos apresentados pelas crianças do grupo caso do estudo utilizou-se o *software* CART análise. Observou-se a associação de febre com presença isolada do gene *virA* ($p = 0,0005$; $OR = 33$; $IC95\% = 1,79$ a 608) (FIGURA 9). Foi observado que em todas as crianças que apresentaram febre foram infectadas, o patótipo tinha o gene *virA*.

Figura 7 – Árvore de análise por classificação e regressão da presença de febre com a presença ou ausência de genes de virulência

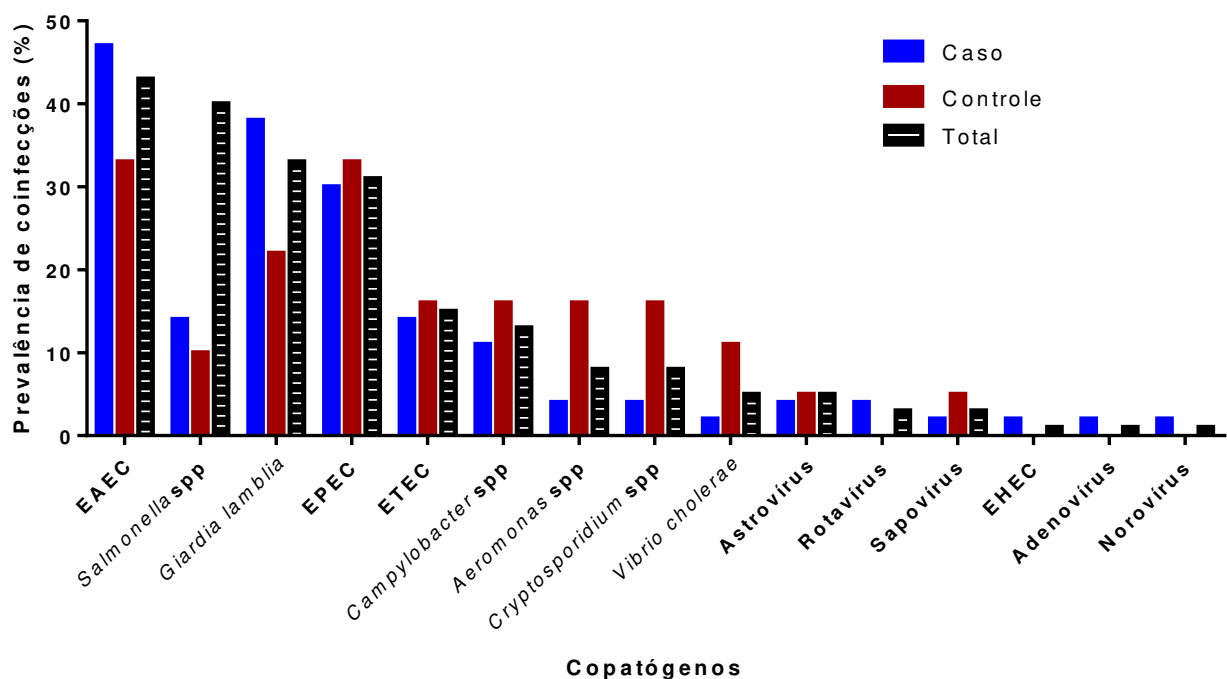


A figura 9 indica a árvore de decisão construída através do CART análise onde buscou-se associação da presença do sintoma febre com a presença de um gene ou de combinações de genes. Os nós à direita representam a presença de gene e os à esquerda representam ausência de gene. A presença do sintoma febre foi associado a presença do gene *virA* ($p = 0,0005$; $OR = 33$, teste exato de Fischer).

5.5 Análise da presença de copatógenos

As amostras fecais de crianças com DNA positivo de *Shigella*/EIEC foram analisadas quanto a presença concomitante de outros enteropatógenos. Verificou-se que 91,6% (55/60) destas amostras positivas para o patótipo apresentavam co-infecções. A maior prevalência de co-infecção foi com a bactéria *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (43,3%, 26/60), seguida de *Salmonella* spp. (40%, 24/60). A menor prevalência foi observada, igualmente, nas co-infecções com a bactéria *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) e com os vírus Adenovírus e Norovírus (1,66%, 1/60). Nenhuma coinfecção foi observada com o protozoário *Entamoeba* spp.

Figura 8 – Distribuição da prevalência das co-infecções entre os grupos caso e controle do estudo



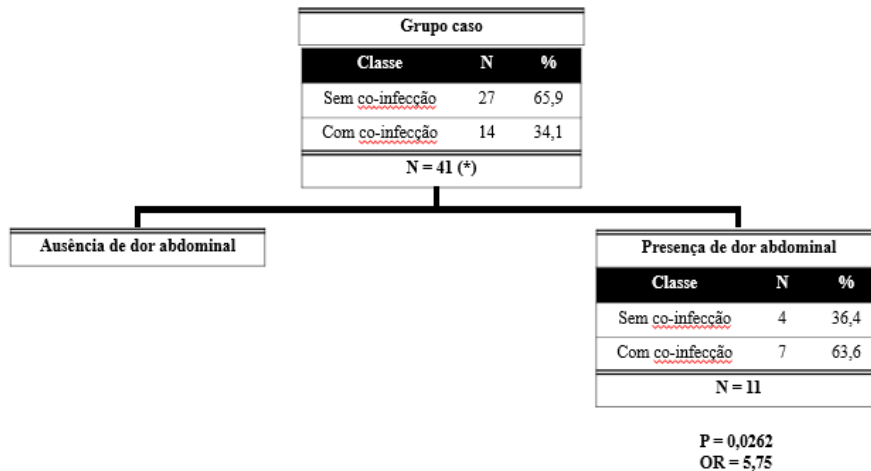
Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 5 mostra a prevalência, em ordem decrescente, de copatógenos detectados nas crianças de cada grupo do estudo. As maiores prevalências foram observadas nas co-infecção com EAEC e *Giardia lamblia*. Quando observou-se a distribuição entre os grupos, estas coinfecções foram maiores no grupo caso em relação ao grupo controle, já as demais coinfecções foram mais prevalentes no grupo de crianças assintomáticas.

Em relação a distribuição entre os grupos caso e controle, observou-se que houve alta prevalência de coinfeções com pelo menos um outro enteropatógeno no grupo caso (92,8%, 39/42) e no grupo controle (88%, 16/18). A prevalência de coinfeções com cada enteropatógeno foi maior entre as crianças assintomáticas, exceto para as coinfeções com *Giardia lamblia* e EAEC em que a prevalência foi maior entre as crianças com diarreia. No entanto, essas diferenças não mostraram significância estatística. As coinfeções com a bactéria *Escherichia coli* Enterohemorrágica e os vírus Adenovírus, Rotavírus e Norovírus foram observadas apenas no grupo caso (FIGURA 4).

Utilizando o *software* CART análise, analisou-se a presença ou ausência, entre os grupos do estudo, de coinfeções do patotipo com um ou mais enteropatógenos, mas não houve associação significativa. E investigou-se também a presença de coinfeções com sintomas apresentados pelas crianças do grupo caso, usando o *software* CART análise para determinar a combinação específica de um ou múltiplos patógenos associados com sintomas nos casos de diarreia. A figura 5 apresenta a árvore de análise CART das amostras com coinfeção de *Shigella*/EIEC com *Salmonella* spp e sintomas clínicos apresentados pelas crianças. Houve associação desta coinfeção com presença de dor abdominal ($p = 0,00262$; OR = 5,75; 95% IC = 1,36 a 20,73).

Figura 9 – Árvore de análise por classificação e regressão de co-infecção de *Shigella*/EIEC com *Salmonella* spp e presença ou ausência de sintomas clínicos



A figura 6 indica a árvore de decisão construída através do CART análise onde buscou-se associação da presença de co-infecção de *Shigella*/EIEC com *Salmonella* spp. com a presença ou ausência de sintomas. Os nós à direita representam a presença de sintomas e os à esquerda representam a ausência de sintomas. A co-infecção foi associada com a presença de dor abdominal e ausência de febre ($p = 0,007$; OR = infinito, pelo teste de Fischer). (*) O dado de detecção de coinfeção com *Salmonella* spp. de 1 criança não foi obtido.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os genes de virulência, a clínica e os copatógenos do patotipo *Shigella*/EIEC detectado em amostras fecais, coletadas entre setembro de 2009 e março de 2011, de crianças com e sem diarreia que residiam distribuídas entre seis cidades localizadas na região do Semiárido Brasileiro. Observou-se a presença do patotipo tanto no grupo caso como no grupo controle, sendo que a presença do patotipo foi significativamente associada ao grupo das crianças com diarreia. Observou-se alta prevalência dos principais genes de virulência e associação de alguns desses com a diarreia. Observou-se também baixa taxa de presença de manifestações clínicas entre as crianças do grupo caso infectadas pelo patotipo e a associação de dado clínico com a presença de gene de virulência. Observou-se alta prevalência de coinfeções entre o patotipo e demais enteropatógenos em ambos os grupos do estudo, além de associação da presença de coinfeção e manifestações clínicas.

A presença do patotipo entre as crianças do estudo foi associada com diarreia, assim como foi observado em outros estudos caso-controle realizados em países em desenvolvimento, nos quais *Shigella* estava entre os patógenos mais associados com diarreia (KOTLOFF et al., 2013; LI et al., 2016). Ainda que em menor prevalência, também pôde-se observar a detecção do patotipo entre as crianças assintomáticas do estudo, o que também foi observado por uma análise de infecção por *Shigella* em estudo caso-controle realizado na Índia (GHOSH et al., 2014). A infecção assintomática de *Shigella* pode ter um papel importante na transmissão da doença dentro de uma comunidade, principalmente para aqueles indivíduos com imunodeficiência, desnutrição ou precária higiene (GHOSH et al., 2014).

A caracterização clínica da Shigelose é descrita, classicamente, como uma inflamação intestinal aguda resultando em fortes dores abdominais, febre, vômitos e diarreia sanguinolenta (MAURELI, 2013). Em estudo coorte de Platts-Mills e colaboradores (2015) os pesquisadores observaram que *Shigella* estava entre os patógenos associados com diarreia severa e que *Shigella* foi, frequentemente, associada com disenteria severa e de longa duração.

No presente estudo, as crianças infectadas pelo patotipo *Shigella*/EIEC apresentaram prevalências baixas de sintomas adicionais a diarreia, sendo o de menor frequência a presença de sangue nas fezes. Essas frequências baixas no presente estudo levaram a uma infecção subclínica do patótipo que pode ser resultado de uma complexa interação de fatores do próprio

microrganismo ou da criança hospedeira. Em relação aos fatores do microrganismo, podem ser citados: a baixa carga de patógenos, o baixo nível de expressão de genes codificadores de fatores de virulência, as co-infecções com outros patógenos e a invasão ou disseminação ineficientes dos patógenos. Em relação aos fatores do hospedeiros cita-se: as condições ambientais precárias, a menor idade da criança, o aleitamento materno e o estado nutricional e imunológico do indivíduo, incluindo a susceptibilidade deste à infecção (CONTRERAS et al., 2010). Estudo multicêntrico de Kosek e colaboradores (2017) em que foi observada a detecção de patógenos em crianças assintomáticas, sugere que, a longo prazo, a infecção anterior assintomática possa causar uma manifestação clínica posterior com prejuízo no crescimento e no desenvolvimento daquela criança. Portanto deve-se atentar tanto às infecções severas pelo patótipo como à aquelas infecções com baixa prevalência de sintomas ou assintomática.

A habilidade de *Shigella*/EIEC causar infecção tem sido atribuída a codificação de proteínas pelos genes de virulência que são encontrados nas ilhas de patogenicidade e no plasmídeo de virulência do patotipo (MAURELLI, 2013). No entanto, informações sobre estes genes não são muitas vezes reunidas para criar uma descrição detalhada sobre a infecção e como isso se traduz em sintomas da Shiglose (MATTOCK; BLOCKER, 2017). Muitos estudos têm investigado genes de virulência de *Shigella* proveniente de amostras clínicas em diferentes países como Argentina (CASABONNE et al., 2016), Costa do Marfim (ANTOINE et al., 2010), Índia (GHOSH et al., 2014; SANGEETHA et al., 2014), Irã (NAVE et al., 2016; RANJBAR et al., 2017; YAGHOUBI et al., 2017), Peru (LLUQUE et al., 2015) e China (QU et al., 2014; FAN et al., 2017), mas a associação da presença de genes de virulência específicos com desfechos clínicos da doença ainda é rara.

No Brasil, poucos estudos investigaram genes de virulência em isolados de *Shigella*, um na região Sudeste, estado de Minas Gerais (SOUZA et al., 2013), e os outros dois na região Norte, Manaus e Porto Velho (CRUZ et al., 2014; SILVA et al., 2008). Entretanto, o baixo número de genes de virulência analisados, média de aproximadamente 7 genes por estudo, deixou ainda algumas lacunas no entendimento da virulência de *Shigella* spp. no Brasil. Na cidade de Fortaleza, na região do Nordeste, nosso grupo de pesquisa propôs quatro painéis de PCR multiplex, com 16 genes de virulência ao todo, para analisar a presença destes genes em amostras de DNA de *Shigella* isoladas de crianças que tinham diarreia moderada a severa, além

de analisar a associação dos genes detectados com sintomas das crianças (MEDEIROS et al., 2017).

A fim de elucidar alguns aspectos da patobiologia da infecção pelo patotipo *Shigella*/EIEC foram propostos novos painéis de PCR múltiplos, adicionais ao estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, totalizando 28 genes codificadores de virulência. Esses painéis foram usados para a detecção de genes de virulência nas amostras de DNA fecal de crianças com diarreia e assintomáticas do presente estudo. Além disso, avaliou-se associações destes genes, isolados ou em combinação, com a presença ou ausência de sintomas.

Foi observado que o gene *iucB* (90%, 54/60) foi o mais prevalente entre todas as crianças diagnosticadas com o patotipo, seguido pelo gene *iutA* (83,3%, 50/60). Estes genes estão localizados nas ilhas de patogenicidade SHI-2 e SHI-3 do cromossomo do patotipo e são responsáveis pela aquisição de ferro pela bactéria. O locus *iuc*, contido nas duas ilhas, expressa a síntese de aerobactina e o seu receptor de membrana externa que são imprescindíveis para o crescimento bacteriano dentro do hospedeiro mamífero (MAURELI, 2013) e o gene *iutA* codifica o receptor bacteriano para o complexo ferro-aerobactina (MATOCK; BLOCKER, 2017). Então, estes dois genes contribuem para a sobrevivência e a capacidade de causar doença pois favorecem a aquisição do ferro, que é um cofator de várias enzimas envolvidas em processos biológicos básicos da bactéria, como a replicação de DNA e a respiração (WEI; MURPHY, 2016). Corroborando com o presente estudo, Sousa e colaboradores (2013) detectaram o gene *iuc* em todas as cepas isoladas de pacientes com infecção por *Shigella*.

Houve alta prevalência de genes de virulência detectados nas amostras de crianças do grupo controle do presente estudo, assim como observado em outro estudo caso-controle realizado na China (GHOSH et al., 2014). A presença destes genes detectados nas crianças assintomáticas sugere que, devido aos vários processos de regulação da expressão gênica existentes, a simples presença de um gene não significa que este será expresso em proteínas e exercerá sua função na patogenicidade da doença resultando em sintomas clínicos (EDBERG et al., 2009). O gene *stx*, que tem a função de codificar a toxina Shiga associada a complicações severas e letais foi detectado apenas em uma criança que se apresentou assintomática. Portanto, o impacto clínico da presença de genes de virulência deve ser sempre ponderado (EDBERG et al., 2009).

Observando a distribuição dos genes entre os grupos, o presente estudo detectou que os genes *sen*, *ipgB2*, *ospF* e *ipgB1* foram associados a diarreia. Não foram encontrados estudos do tipo caso-controle em que houvessem associações destes genes com algum dos grupos. Em estudo recente no Irã, que objetivou associar diarreia pediátrica causada por *Shigella* com hospitalização e sangue nas fezes, o gen *sen*, que expressa a enterotoxina ShET2, foi o que se mostrou presente nesta associação (YAGHOUBI et al., 2017) e, em outro estudo no Brasil, este gene também foi associado a sangue nas fezes (CRUZ et al., 2014), sugerindo assim que este gene é fator preponderante de casos de diarreia severos. Os demais genes associados no nosso estudo ainda não foram pesquisados por outros estudos. O gene *ospF* codifica o efector OspF que está envolvido diretamente na supressão da resposta imune inata em células epiteliais e/ou macrófagos do hospedeiro, contribuindo assim para o processo inflamatório desencadeado pelo patotipo e, conseqüentemente, para a diarreia (MAURELLI, 2013; MATTOCK; BLOCKER et al., 2017). Os genes *ipgB1* e *ipgB2* codificam os fatores IpgB1 e IpgB2, respectivamente, que são efetores importantes na invasão celular. Estes efetores promovem o remodelamento da actina e do citoesqueleto das células do hospedeiro levando a um estresse epitelial, inflamação e, conseqüentemente, à diarreia (MATTOCK; BLOCKER et al., 2017).

Na análise da relação dos genes de virulência detectados neste estudo com dados de sintomas clínicos adicionais a diarreia, observou-se associação da presença do gene *virA* com febre, sugerindo que o fator de virulência VirA tenha forte impacto na patogênese da infecção pelo patotipo nas crianças do estudo. Não foram encontrados estudos em que houvessem associações deste gene com algum sintoma clínico em crianças infectadas pelo patotipo. Em estudo de Yoshida e colaboradores (2006), que investigou o papel do VirA no processo de motilidade intracelular através do uso de microscopia de imunofluorescência em células infectadas, os autores observaram que este efector tem a capacidade de degradar os microtúbulos por atividade semelhante a protease cisteína, sendo fundamental para a disseminação inter e intracelular do patotipo nas células do hospedeiro e culminando em um processo que leva à disenteria bacilar. Diante disso, esse substancial impacto do efector VirA na patogênese do patotipo *Shigella*/EIEC corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Além de analisar o impacto de um único patógeno nos casos de diarreia, estudos sugerem que deve-se considerar o impacto de comunidades de enteropatógenos em coinfeções nos casos de diarreia (SERRANO et al., 2014). Vários estudos têm reportado episódios de diarreia

causados por co-infecção em ambos países desenvolvidos (LEVIDIOTOU et al., 2009; VALENTINI et al., 2013) e em desenvolvimento (BHAVNANI et al., 2012; KOTLOFF et al., 2013). E ainda, as coinfeções podem levar ao aumento nos custos do tratamento da diarreia, provavelmente como resultado das complicações clínicas devido às interações entre copatógenos (HARRIS et al., 2009). Portanto, estudos orientam que se faz imprescindível a investigação do papel das coinfeções de patógenos entéricos em pessoas acometidas de diarreia aguda (JOHNSON et al., 2015). Além disso, é importante incluir na investigação pacientes controles a fim de comparar a distribuição da exposição em controles saudáveis e casos (LI et al., 2016).

No presente estudo, 91,6% (55/60) das crianças apresentavam co-infecções de *Shigella*/EIEC com pelo menos um outro enteropatógeno. Em relação aos grupos do estudo, 92% (39/42) das crianças que apresentavam diarreia e 88% (16/18) das crianças controle saudáveis possuíam co-infecções com pelo menos um outro enteropatógeno. Observando-se assim que as co-infecções tiveram altas prevalências nos dois grupos do estudo, assim como foi observado em estudo caso-controle sobre a etiologia da diarreia na China de Li e colaboradores (2016). A alta proporção de detecção de co-infecções em crianças assintomáticas provenientes de comunidades foi observada em estudo de Lima e colaboradores (2017) que analisou a prevalência de copatógenos em infecções subclínicas por *Escherichia coli* Enteroagregativa. Sugere-se que essa alta prevalência de co-infecções no grupo controle do presente estudo seja devido a possível baixa carga de patógenos que colonizavam as crianças assintomáticas e não foi suficiente para que as coinfeções levassem a infecções diarreicas. Por isso, estudos sugerem que avaliar as cargas de patógenos pode melhorar a identificação de agentes patogênicos que causam diarreia em crianças, principalmente aqueles que estão frequentemente presentes em ambas as crianças sintomáticas e assintomáticas (LINDSAY et al., 2013; LIU et al., 2014).

Ainda sobre as coinfeções, o presente estudo analisou a presença de copatógenos com a presença ou ausência de sintomas apresentados pelas crianças com diarreia. E pôde-se observar a associação significativa entre a coinfeção com a bactéria *Salmonella* spp. e a presença de dor abdominal.

Salmonella spp. está entre as principais causas de diarreia bacteriana no mundo todo, resultando em 93,8 milhões de casos de gastroenterite e 155 mil mortes por ano (MAJOWICZ et al., 2010; TADESSE, 2014). Semelhante a *Shigella*, *Salmonella* spp. estão entre os patógenos associados a doenças transmitidas por alimentos, tem apresentado espécies resistentes a

antimicrobianos e tem o T3SS como sistema secretor de proteínas efetoras de virulência (DEKKER; FRANK, 2015; MAMA; ALEMU, 2016). Não foram encontrados estudos da infecção concomitante dos dois patógenos.

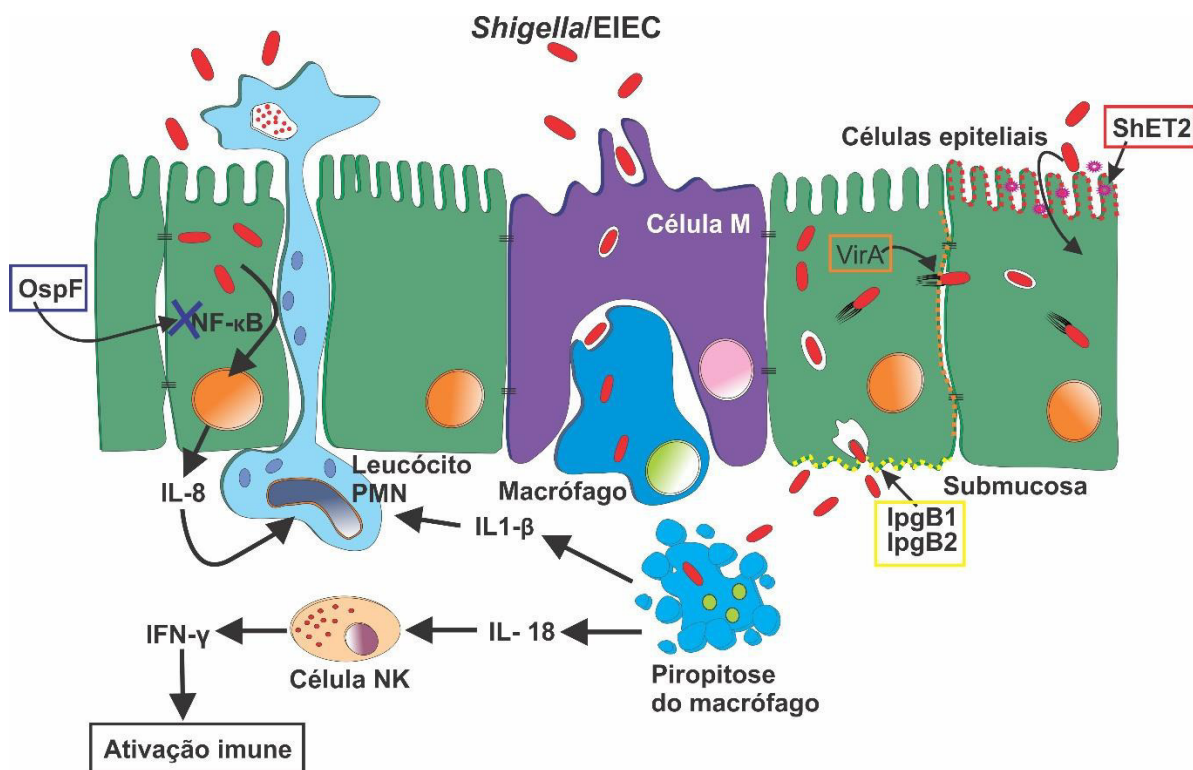
O presente estudo teve algumas limitações. A coleta de amostras foi realizada durante diferentes linhas de tempo para cada cidade, não podendo se avaliar a sazonalidade da infecção pelo patotipo *Shigella*/EIEC. O número de amostras positivas para o patotipo foi pequeno frente a população total de crianças do estudo, dificultando assim a realização de estudos quanto a análise de positividade e negatividade para o patotipo.

7. CONCLUSÃO

- Este estudo demonstrou a *Shigella*/EIEC como um importante patotipo entérico associado com diarreia em crianças no semiário brasileiro, onde detectou-se a presença do patotipo em 60% (42/70) das crianças do grupo caso e em 23% (18/78) do grupo controle;
- Os genes que codificam fatores relacionados à gravidade da infecção como a enterotoxina ShET2, os fatores IpgB1 e IpgB2 que promovem o remodelamento da membrana da submucosa e a captação da bactéria pelo fagossomo, além do fator OspF que promove a inibição da resposta imune inata pela inibição de NF-κB foram associados aos casos de diarreia e sugere-se grande importância destes no desfecho clínico da infecção (Figura 10);
- Na análise de associação da presença de genes e sintomas, foi observada associação do gene *vira*, que codifica o fator VirA responsável pela disseminação intra e intercelular da bactéria, com a febre relatada nas crianças, sugerindo impacto clínico deste gene na infecção;
- Verificou-se que 91,6% (55/60) das amostras positivas para o patotipo apresentavam co-infecções, sendo que o copatógeno mais frequentemente associado foi EAEC, seguido de *Salmonella* spp., cuja esta última co-infecção foi associada com a presença de dor abdominal sugerindo aumento da gravidade da infecção;
- O amplo painel de detecção de genes de virulência de *Shigella*/EIEC desenvolvido neste estudo caracterizou a diversidade de genes de virulência apresentados pelo patotipo detectado no estudo. Além disso, pode-se relacionar os genes detectados aos sintomas

clínicos apresentados pelas crianças. Estes dados somados a avaliação da interação de copatógenos de *Shigella*/EIEC no presente estudo corroboram para o melhor entendimento da patobiologia da infecção por *Shigella*/EIEC.

Figura 10 – Modelo de patobiologia da infecção por *Shigella*/EIEC destacando os fatores associados a desfecho clínico observado no presente estudo



A figura 10 indica os genes codificadores de virulência associados com desfechos clínicos nas crianças e seus locais de ação diante da patobiologia da infecção por *Shigella*/EIEC

9. REFERÊNCIAS

AL-HASANI, K. et al. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infection and Immunity**, v.68, p.2457–2463, 2000.

AL-HASANI, K. et al. The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS ONE**, v.4, n.12, p.e8223, 2009.

ANDERSON, M. et al. *Shigella* diversity and changing landscape: insights for the twenty-first Century. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 45, p.1-9, 2016.

ANDRADE, J. A. B. DE; FAGUNDES-NETO, U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 3, p. 199–205, 2011.

ANTOINE, B. et al. Virulence Factors and Resistance Profile of *Shigella* Isolated During Infectious Diarrhea in Abidjan, Côte D'Ivoire. **Journal of Applied Science Research**, v. 6, p. 594-599, 2010.

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

BARTELT, L. A. et al. Barriers to Child Development and Human Potential: The Case for Including the “Neglected Enteric Protozoa” (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs. **PLOS**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2013.

BELD, M.J.C.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p.899-904, 2012.

BELD, M.J.C. et al. Multicenter evaluation of molecular and culture-dependent diagnostics for *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli* in the Netherlands. **Journal of Microbiological Methods**, v. 131, p.10-15, 2016.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z., SANSONETTI, P. J., PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 123–135, 1995.

BHAVNANI, D. et al. Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. **American Journal of Epidemiology**, v. 176, p. 387-395, 2012.

BINET, R.; DEER, D.M.; UHLFELDER, S.J. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. **Food Microbiology**, v. 40, n. 1, p.48-54, 2014.

BONKOUYOU, I.J. et al. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Pediatrics**, v. 13, n. 36, p. 1-6, 2013.

BOISEN N. et al. Short report: High Prevalence of Serine Protease Autotransporter Cytotoxins among Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.

BUCHAN, B.W. et al. Clinical evaluation of a real-time PCR assay for identification of *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* and *C. coli*), and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p.4001-4007, 2013.

CASABONNE, C. et al. Prevalence and virulence factors of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in Rosario, Argentina. **Japanese journal of infectious diseases**, p. 1-18, 2016.

COCCIOLILLO, S.; COLLINS, S. M. The long-term functional consequences of acute infectious diarrhea. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 32, p. 1-16, 2015.

CONTRERAS, C.A. et al., Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 25-31, 2010.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p.822-880, 2013.

CRUZ, C.B.N. et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **Biomed Research International**, p. 1-9, 2014.

DAS, J.K. et al. Global burden of childhood diarrhea and interventions. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p.451-458, 2014.

DEKER, J. FRANK, K. *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, p. 225-246, 2015.

DONG, N., ZHU, Y., LU, Q., HU, L., ZHENG, Y., AND SHAO, F. Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. **Cell**, v. 150, p. 1029–1041, 2012.

DUPONT, H. L. Persistent diarrhea: a clinical review. **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 24, p. 2712-2723.

EDBERG, S. C. Does the possession of virulence factor genes mean that those genes will be active ? **Journal of Water and Health**, p. 19-28, 2009.

EGILE, C.; LOISEL, T.; LAURENT, V. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. **The Journal of Cell Biology**, v. 146, p.1319–1332, 1999.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 2, p.140-148, 2003.

- EWING, E.H., 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, fourth ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York.
- FAHERTY, C.S., MAURELLI, A.T. Spa15 of *Shigella flexneri* is secreted through the type III secretion system and prevents staurosporine-induced apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 5281–5290, 2009.
- FAN, W. et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. **Gut Pathogens**, v. 9, p. 2017.
- FARFAN, M. J. A new multiplex PCR for differential identification of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* and detection of *Shigella* virulence determinants. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 4, p. 525-533, 2010.
- FARFÁN, M.J. et al. *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p.332-339, 2011.
- FERDOUS, F. et al. Aetiology and clinical features of dysentery in children aged <5 years in rural Bangladesh. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 1, p. 90–98, 2014.
- FRICKMANN, H. et al. PCR for enteric pathogens in high-prevalence settings. What does a positive signal tell us? **Infectious Diseases**, v. 47, n. 7, p.491-498, 2015.
- FRANKEL G. et al. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stools. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1729-1734, 1989.
- FUNG, C.C. et al. Virulence variations in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* using the *Caenorhabditis elegans* model. **Fems Microbiology Letters**, v. 362, n. 3, p.1-5, 2015.
- GALAN, J.E., WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, p.567–573, 2006.
- GARGANO, J. W. et al. Mortality from selected diseases that can be transmitted by water – United States, 2003 – 2009. **Journal of Water and Health**, v. 15, n. 3, p. 438-450, 2017.
- GOH, K. et al. Arginine-dependent acid-resistance pathway in *Shigella boydii*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 3, p. 179–85, 2011.
- GOSH, S. et al. Genetic characterization of *Shigella* spp. Isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 903-910, 2014.
- GUAN, H. et al. Evaluation of PCR based assays for the improvement of proportion estimation of bacterial and viral pathogens in diarrheal surveillance. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-10, 2016.
- GUERRANT, R.L. et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 4, p.220-229, 2012.

GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microbial Pathogenesis**, v.45, p.115–123, 2008.

HARRIS, J.B. et al. Immunologic responses to *Vibrio cholera* in patients co-infected with intestinal parasites in Bangladesh. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 430, 2009.

HAZEN, T.H. et al. Investigating the relatedness of enteroinvasive *Escherichia coli* to other *E. coli* and *Shigella* isolates by using comparative genomics. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p.2362-2371, 2016.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanism. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2010.

HOSAGANDI, D. et al. WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: meeting report. **Vaccine**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

INGERSOLL MA, ZYCHLINSKY A. ShiA abrogates the innate T-cell response to *Shigella flexneri* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2317–2327, 2006.

IWAI, H. et al. A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. **Cell**, v.130, p.611–623, 2007.

JIN Q, YUAN Z, XU J, ET AL. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 4432–4441, 2002.

JOHNSON, P.T.J. et al. Why infectious disease research needs community ecology. **Science**, v. 349, 2015.

KAMINSKI, R. W. et al. Development and preclinical evaluation of a trivalent, formalin-inactivated *Shigella* whole-cell vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 3, p.366-382, 2017.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KIM, M., OGAWA, M., FUJITA, Y., et al. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. **Nature**, v. 459, p. 578–582, 2009.

KIRK, M.D. et al. Correction: World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010. **Plos Medicine**, v. 12, n. 12, p.e1001940, 2015.

KOTLOFF, K.L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p.209-222, 2013.

KOTLOFF, K.L. et al. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p.799-814, 2017.

- KOTLOFF, K. L. et al. Shigellosis. **The Lancet**, p. 1-12, 2017.
- KOSEK, N.K. et al. Causal pathways from enteropathogens to environmental enteropathy: findings from the MAL-ED birth cohort study. **EBioMedicine**, v. 8, n. 2017, p. 109-117, 2017.
- KOZAK, G. K. et al. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. **Journal of food protection**, v. 76, n. 1, p. 173–83, 2013.
- LAN, R. et al. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n.10, p. 6303–6309, 2001.
- LAN, R. et al. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p. 5080–5088, 2004.
- LANATA, C.F. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children: A systematic review. **Plos One**, v. 8, n. 9, p.e72788, 2013.
- LEE, G. et al. An instrument for the assessment of diarrhoeal severity based on a longitudinal community-based study. **BMJ Open**, v. 4, n. 6, p.e004816-e004816, 2014.
- LEVIDIOTOU, S.G. et al. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 596-598, 2009.
- LI L. L. et al. Aetiology of diarrhoeal disease and evaluation of viral-bacterial co-infection in children under 5 years old in China: a matched case-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 318.e9 – 318.e16, 2016.
- LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 381, p. 39-44, 1992
- LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; LIMA, A. A M. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Current opinion in gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30–7, 2015.
- LIMA, A. A. M. et al. Enteroaggregative *E. coli* subclinical infection and co-infections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 325-333, 2017.
- LINDSAY, B. et al. Association Between *Shigella* Infection and Diarrhea Varies Based on Location and Age of Children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p.918-924, 2015.
- LINDSAY, B. et al. Quantitative PCR for detection of *Shigella* improves ascertainment of *Shigella* burden in children with moderate-to-severe diarrhea in low-income countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1740-1746, 2013.
- LIU, J. et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogenic causing childhood diarrhea: a multicenter study. **Lancet**, v. 14, p. 716-724, 2014.

- LIU, J. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **Lancet**, v. 388, p.1291–301, 2016.
- LIU J. et al. Direct detection of *Shigella* in stool specimens by use of a metagenomic approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, p. 1-8, 2018
- LLUQUE, A. et al. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). **International Journal of Medical Microbiology**, p. 1-11, 2015.
- LUSCHER D; ALTWEGG M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. **Molecular Cell Probes Journal**, v. 8, n. 4, p. 285-290, 1994.
- MAJOWICZ, S.E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, p. 882-889, 2010.
- MAMA, M. ALEMU, G. Prevalence antimicrobial susceptibility patterns and associated risk factors of *Shigella* and *Salmonella* among food handlers in Arba Minch University, South Ethiopia. **BMC Infectious Disease**, v. 16, 2016.
- MARTINIC, M. *et al.* Contribution of the lipopolysaccharide to resistance of *Shigella flexneri* 2a to extreme acidity. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. 1-11, 2011.
- MARTINO, M.L.D. et al. Molecular evolution of the nicotinic acid requirement within the *Shigella*/EIEC pathotype. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p.651-661, 2013.
- MATTOCK, E.; BLOCKER, A.J. How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 64, p.1-24, 2017.
- MAURELLI, A.T. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host– parasite interactions. **Escherichia Coli**, p. 215-245, 2013.
- MCCRICKAD, L. S. et al. Disparities in severe Shigellosis among adults – Foodborne diseases active surveillance network, 2012-2014. **BMC Public Health**, v. 18, n. 221, p. 1-8, 2018.
- MEDEIROS, P.H.Q.S. et al. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 1-8, 2017.
- MENDES, P.S.; RIBEIRO, H.D.A.C.; MENDES, C.M. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **Journal Pediatrics**, v. 89, n. 3, p. 315-25, 2013.
- MICHELACCI, V. et al. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, p.287e.11-287e.19, 2015.

- MOORE, S.R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p.1156-1164, 2010.
- MORENO, A.C. et al. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 301, p. 156-163, 2009.
- MORENO, A.C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 50-57, 2010.
- MORENO, A.C.R. et al. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 138-141, 2012.
- MOUNIER, J., BONCOMPAIN, G., SENEROVIC, L., LAGACHE, T., CHRÉTIEN, F., PEREZ, F., et al. Shigella effector IpaB-induced cholesterol relocation disrupts the Golgi complex and recycling network to inhibit host cell secretion. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 381-389, 2012
- NAVE et al. Distribution of genes encoding virulence factors and molecular analysis of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea in Kerman, Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 68-71, 2016.
- NUNES, M.R. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility of the bacterium to antimicrobials: a study in Teresina, Piauí, Northeast of Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 2, p.125-128, 2012.
- NYGREN, B.L. et al. Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998-2008. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 02, p. 233-241, 2012.
- OPERARIO, D.J.; HOUPPT, E. Defining the causes of diarrhea. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 464-471, 2011.
- PARSOT, C. et al. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **Fems Microbiology Letters**, v. 252, n. 1, p.11-18, 2005.
- PAVLOVIC, M. et al. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p.1245-1251, 2011.
- PENDARIES, C., ARBIBE, L., MOUNIER, J., GOZANI, O., CANTLEY, L., FRY, M. J., et al. PtdIns(5)P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. **EMBO J**, v. 25, p. 1024-1034, 2006.
- PENG, J.; YANG, J.; JIN, Q. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p.147-152, 2009.
- PETRI, W.A. et al. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p.1277-1290, 2008.

- PETTENGILL, E.A.; PETTENGILL, J.B.; BINET, R. Phylogenetic analyses of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* for the identification of molecular epidemiological markers: Whole-genome comparative analysis does not support distinct genera designation. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2016.
- PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, p. 1-12, 2015.
- PUPO, G.M.; LAN, R.; REEVES, P.R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10567-10572, 2000.
- QU, M. et al. Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China. **Journal of Infection**, v. 65, p. 214-222, 2012.
- QUETZ, J. S. et al. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 507-513, 2012.
- RANJBAR, R. et al. Virulotyping of *Shigella* spp. Isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 2017.
- RASELLA, D. et al. Effect of a conditional cash transfer programme on childhood mortality: a nationwide analysis of Brazilian municipalities. **The Lancet**, v. 382, n. 9886, p. 57-64, 2013.
- RATHAUR, V.K. et al. Clinical study of acute childhood diarrhoea caused by bacterial enteropathogens. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 5, p. 01-05, 2014.
- ROERICH-DOENITZ, A. D. Regulation of Type III Secretion Hierachy in *Shigella flexneri*. Ph.D. thesis. University of Bristol. 2013.
- SAHL, J.W. et al. Defining the phylogenomics of *Shigella* species: a pathway to diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 951-960, 2015.
- SAMBE-BA, B. et al. Community-acquired diarrhea among children and adults in urban settings in Senegal : clinical , epidemiological and microbiological aspects. **BMC Infectious Disease**, v. 13, n. 580, p. 1-7, 2013.
- SANGEETHA, A. V. et al. Clinical and Microbiological Profiles of Shigellosis in Children. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 32, p. 580-586, 2014.
- SCHARF, R.J. et al. Recent advances in understanding the long-term sequelae of childhood infectious diarrhea. **Current Infectious Disease Reports**, v. 16, n. 6, p. 408-409, 2014.
- SCHROEDER, G.N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.

SERRANO, E. et al. The use of null models and partial least squares approach path modeling (PLS-PM) for investigating risk factors influencing post-weaning mortality in indoor pig farms. **Epidemiology and Infection**, v. 142, p. 530-539, 2014.

SILVA, T. et al. Characterization of *Shigella* spp. By antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 731-733, 2008.

SOUSA, M.A.B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhea prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30-35, 2013.

TADESSE, G. Prevalence of human Salmonellosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Disease**, v. 14, 2014.

THE, H.C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235-250, 2016.

THIAM, S. et al. Prevalence of diarrhea and risk factors among children under five years old in Mbour, Senegal: a cross-sectional study. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 109, p. 1-12.

TROFA AF, UENO-OLSEN H, OIWA R, YOSHIKAWA M. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1303–1306, 1999.

UD-DIN, A. WAHID, S. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1131-1138, 2014.

VALENTINI, D. et al. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 32, p. 909-915, 2013.

VASCONCELOS, M.J.O & BATISTA, M. Doenças diarreicas em menores de cinco anos no Estado de Pernambuco: prevalência e utilização de serviços de saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.11, n. 1, p. 128-138, 2008.

WALKER, et al. Diarrhea as a risk factor for acute lower respiratory tract infections among young children in low income settings. **Journal of Global Health**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2013.

WALKER, R. I. et al. Vaccines against *Shigella* and Enterotoxigenic *Escherichia coli*: a summary of the 2016 VASE conference. **Vaccine**, v. 35, p. 6775-6782, 2017.

WEI, Y. MURPHY, E.R. *Shigella* Iron Acquisition Systems and their Regulation. **Frontier in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. Geneva, New York: p. 68, WHO. 2013.

YAGHOUBI, S. et al. Profiling of Virulence-associated factors in *Shigella* species isolated from acute pediatric diarrheal samples in Tehran, Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 8, p. 220-226, 2017.

YANG, J. et al. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella* spp. **Journal of Molecular Evolution**, v. 64, n. 1, p. 71-79, 2007.

YOSHIDA, S. et al. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. **Science**, v. 314, p. 985–989, 2006.

ZHU, M. et al. Analysis of the aetiology of diarrhea in outpatients in 2007, Henan province, China. **Epidemiology and Infection**, v. 141, p. 540-548, 2012.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 338/09

Fortaleza, 20 de novembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Semi-Árido Brasileiro: Objetivos 2a e 2c)*

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrointestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é uma parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados. Faremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrointestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrointestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque mora numa cidade situada na região do semi-árido brasileiro e está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma diarreico nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarreicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarreias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarreica. Observamos que a ocorrência de doenças diarreicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar no crescimento linear da criança. Episódios de diarreia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarreicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarreicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos testado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e arginina, na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarreicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Parque Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarreicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 20 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarreia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarreicas quando as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e da carência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesivo da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarreia, se faz necessária a avaliação destes agentes em crianças que não residem nessas comunidades. Os resultados deste estudo para os participantes serão mensurados em termos de conhecimento do risco para as doenças diarreicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará uma amostra de fezes e um pouco de saliva, através de um bochecho, de sua criança;
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais;
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário;
4. As amostras serão enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas para realizar testes específicos para este estudo. As amostras de fezes serão avaliadas através de métodos e técnicas de biologia molecular para a detecção de bactérias que prejudicam o intestino;
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo para futuras validações dos testes.

Benefícios:

A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou de crescimento de bactéria reconhecidamente prejudicial ao intestino será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será indicada pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Versão: 06.04.2009

(Versão: 001)


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMPEPE/UFCE

Página 1 de 2

CONT. ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Danos:

Se seu filho apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone: 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a alguém do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETRA FORMA)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)

dd/ mm/ ano

Assinatura da Testemunha

dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

dd/ mm/ ano


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C – FORMULÁRIO

ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO			
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código	Resposta
01	Data da Aplicação do Questionário	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre a criança:			
02	Data de nascimento	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Sexo	1=masculino; 2=feminino	<input type="checkbox"/>
04	Alimentação da criança	1=amamentação exclusiva; 2=amamentação não-exclusiva; 3=não amamenta mais; 4=nunca foi amamentada; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
05	Se a resposta anterior for 3 (não amamenta mais), por quanto tempo a criança foi amamentada?	meses	<input type="text"/> <input type="text"/>
Antropometria:			
06	Peso	kg	, <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
07	Altura	cm	, <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
08	Circunferência da cabeça	cm	, <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre o responsável:			
09	Grau de parentesco com a criança	1=mãe; 2=pai; 3=avó (ô); 4=vizinha(o); 5=tia (o), 6=outro	<input type="checkbox"/>
10	Caso a resposta à questão anterior seja 6 (outro parentesco), favor especificar.		_____
11	Idade da mãe da criança	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	Grau de escolaridade da	1= não estudou;	<input type="checkbox"/>



	mãe	2=primário incompleto; 3=primário completo; 4=secundário incompleto; 5=secundário completo, 6=superior incompleto; 7=superior completo; 9=não sabe	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
13	Idade da primeira gestação	anos	
Condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias da família da criança:			
14	Qual o tipo de casa em que a criança vive?	1=taipa; 2=alvenaria; 3=mista; 4=outra; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
15	Caso a resposta à questão anterior seja 4 (outro tipo de habitação), favor especificar.		_____
16	Número total de cômodos/compartimentos da casa		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
17	Número total de habitantes da casa (crianças e adultos)		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
18	Número de habitantes da casa menores de 5 anos		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
19	Renda familiar (em salários mínimos)	1= < ½ ; 2= ½ a ≤1; 3=1 a ≤2; 4=2 a ≤3; 5=3 a ≤5; 6= >5; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
20	A água de beber da casa é proveniente de	1= água encanada; 2=poço profundo; 3=cacimba; 4=carroça; 5=rio/açude; 6=cisterna; 7=carro pipa; 8=água mineral; 9=não sabe; 10=outra fonte	<input type="checkbox"/>
21	Caso a resposta à questão anterior seja 10 (outra fonte de água), favor especificar.		_____
22	O que faz antes de utilizar a	1= ferve; 2=usa filtro;	



	água para beber?	3=usa solução de cloro; 4=nenhuma ação; 5=outra; 9=não sabe	
23	Caso a resposta à questão anterior seja 5 (outra ação), favor especificar.		_____
24	Tipo de esgotamento sanitário da casa	1=fossa; 2=rede/esgoto público (sanear); 3=sem sistema de esgoto	<input type="checkbox"/>
25	Há sanitário dentro da casa?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
26	Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
27	Com qual frequência água corrente e sabão são utilizados para lavar as mãos?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=raramente; 5=nunca; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
28	Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=não ou raramente, 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
29	Animais costumam ficar dentro de casa ou ao redor (no quintal)?	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
30	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar qual(is) animal(is).		_____
Condições clínicas da criança			
31	Sua criança apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas? (CASO A RESPOSTA SEJA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 38)	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
32	Caso a resposta à questão		<input type="checkbox"/>

	anterior seja 1 (sim), favor especificar a quantos dias a criança vem apresentando diarreia.		
33	Quantas evacuações em 24 horas? (Maior número recordado)		<input type="text"/> <input type="text"/>
34	Sinais/sintomas observados pelo guardião ou reportados pela criança:		
34.1	Dor abdominal	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
34.2	Vômito		<input type="checkbox"/>
34.3	Muco nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.4	Sangue nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.5	Fraqueza		<input type="checkbox"/>
34.6	Inquietação		<input type="checkbox"/>
34.7	Tosse ou sintomas respiratórios		<input type="checkbox"/>
34.8	Desidratação (Entrevistador, favor se reportar à tabela 1, em anexo, para classificação de desidratação ao final do questionário)	1=moderada; 2=grave; 7=grau não identificado; 8=não está desidratada; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9	Febre	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9.1	Caso tenha realizado medida com termômetro, informe a maior medida recordada.	Medida em °C (ou ND)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
34.10	Outros sintomas ou doenças concomitantes	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
35	Caso a resposta à questão 34.10 seja 1 (sim), favor especificar.		_____
36	A criança recebeu algum tratamento durante a diarreia?	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>

37	Caso a resposta à questão 36 seja 1 (sim), favor especificar.				
38	Sua criança apresentou diarréia nos últimos 14 dias?	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>		
Situação vacinal da criança					
39. A criança recebeu as seguintes vacinas? 1= sim; 2=não; 9=não sabe					
39.1	BCG <i>(ao nascer, contra formas graves de tuberculose)</i>	ao nascer	<input type="checkbox"/>		
39.2	SRC <i>(sarampo, rubéola, caxumba, 12 meses)</i>	12 meses	<input type="checkbox"/>		
39.3	Hepatite B <i>(ao nascer, reforços em 1 e 6 meses)</i>	1 mês <input type="checkbox"/>	6 meses <input type="checkbox"/>		
39.4	VORH <i>(vacina oral contra rotavírus humano; 2 e 4 meses)</i>	2 meses <input type="checkbox"/>	4 meses <input type="checkbox"/>		
39.5	Hib <i>(meningite e outras infecções causadas pelo <u>Haemophilus influenzae</u> tipo B; 2, 4 e 6 meses)</i>	2 meses <input type="checkbox"/>	4 meses <input type="checkbox"/>	6 meses <input type="checkbox"/>	
39.6	DPT: “Tríplice” <i>(difteria, tétano, coqueluche: 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	2 meses <input type="checkbox"/>	4 meses <input type="checkbox"/>	6 meses <input type="checkbox"/>	15 meses <input type="checkbox"/>
39.7	VOP: “Gotinha” <i>(vacina oral contra pólio; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	2 meses <input type="checkbox"/>	4 meses <input type="checkbox"/>	6 meses <input type="checkbox"/>	15 meses <input type="checkbox"/>

Questões para o entrevistador

40	Foi coletada amostra de fezes?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
41	Foi coletada amostra de saliva?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
42	A criança foi classificada como caso ou controle?	1= caso; 2=controle	<input type="checkbox"/>

ANEXO D – Manuscrito do Artigo em Processo de Submissão**Virulence genes, clinics and copathogens of *Shigella*/Enteroinvasive *E. coli* pathotype infection in children with and without diarrhea from Brazilian semiarid region**

Mariana Duarte Bona¹, Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiros¹, Ana Karolina Silva dos Santos¹, Thiago Miranda de Freitas¹, Mara Moura Gondim Prata¹, Marília Maia Gurgel do Amaral¹, Alexandre Havt¹, Aldo Ângelo Moreira Lima¹

¹ Institute of Biomedicine for Brazilian Semiarid, Federal University of Ceará, 1315 Coronel Nunes de Melo, 60430-270, Fortaleza, Brazil.

Running head: *Shigella*/Enteroinvasive *E. coli* virulence in children with and without diarrhea

Address correspondence to Mariana Duarte Bona: marianadbona@gmail.com

*Present address: Clinical Research Unit and Institute of Biomedicine, R. Cel. Nunes de Melo, N 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brasil CEP 60.430-270, phone: 55 (85) 3366-8440.

ABSTRACT

Background: *Shigella* and *Escherichia coli* Enteroinvasive (EIEC) constitute the pathotype *Shigella*/EIEC that cause Shigellosis. This infection is an important world public health problem, mainly in the children in development countries, because its clinic severity, lack of vaccine and high rate of antimicrobial resistance. This study aimed to develop primers for virulence-related genes and to evaluate clinical symptoms and coenteropathogens of *Shigella*/EIEC intestinal infection of children from case-control study on Brazilian Semiarid.

Methods: It was carried out a case-control study in six different cities of semiarid with 1200 children with 2 to 36 age months, distributed in the case group, when they had diarrheal episodes

in the last 24 hours, and in the control group, when they had not diarrheal episodes. Fecal samples of each children were collected and its DNA was extracted for pathogens diagnosis by Luminex Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, California, EUA), which 148 (12.33%) samples were obtained with positive DNA for *Shigella*/EIEC. From these 148 samples, fecal DNA was reextracted and the diagnosis was made by conventional PCR. The positive DNA for the pathotype was used for the detection of virulence genes. The clinic, demographics and socioeconomic data were obtained by questionnaire answered by children parents or responsables.

Results: It was detected the pathotype in 7.05% (42/596) of case group children and in 2.98% (18/604) of control group, with association of pathotype detection and presence of diarrhea ($p = 0.0013$, OR = 2.47, 95% CI = 1.4 to 4.3). About clinical manifestations addicted to diarrhea, it was observed that the infected and symptomatic children had mild symptoms. It was analyzed 28 virulence genes, of which some genes were associated with diarrhea cases: the gene *sen* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; IC95% = 1.27 to 14.15), which encodes the ShET1 enterotoxin; genes *ipgB2* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; IC95% = 1.27 to 14.15) and *ipgB1* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; IC95% = 1.12 to 11.9), which encodes the ruffling of membrane of host cells; and the gene *ospF* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; IC95% = 1.12-11.9), which encodes the suppression of host immune response. In analysis of virulence genes detected and clinic symptoms and malnutrition, it was observed association of fever and *virA* ($p = 0.0005$; OR = 33; 95% CI = 1.79 to 608) and of malnutrition and *virB* ($p = 0.0275$; OR = 7.11; 95% CI = 1.422 to 36.7).

Conclusion: These data reinforce the impact of *Shigella*/EIEC on diarrhea in children from Brazilian semiarid region and highlighted the contribution of specific virulence markers as *sen*, *ipgB1*, *ipgB2*, *ospF*, *virA* and *virB* for its pathobiology.

1. INTRODUCTION

Shigella species are a leading cause of infectious diarrhea worldwide, particularly in children from developing countries (Liu et al., 2016). Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) is one of the diarrheogenic *E. coli* (DEC) which shares similar biochemical and pathogenesis features with *Shigella* (Maurelli, 2013). Although these pathogens are classically classified in two distinct genus due to historical and clinical reasons, several studies that have employed phylogenetic and genomics analysis do not support this separation (Pupo et al., 2000; Lan et al., 2001; Jin et al., 2002; Escobar-Páramo et al., 2003; Lan et al., 2004; Peng et al., 2009; Yang et al., 2007; Pettengill et al., 2016).

A recent phylogenomic study using large number and diversity of *Shigella* and EIEC genomes showed that *Shigella* and EIEC evolved independently. This analysis also indicates *Shigella* serogroups belong to same lineage, which contradicts the classification of *Shigella* genus in species/serogroups (Pettengill et al., 2016). Genomics studies that attempted to identify specific genes for both *Shigella* and EIEC were not able to find any reliable marker. In light of the pathogenesis and genetic similarities, *Shigella* and EIEC have been suggested to be grouped into a single pathovar *Shigella*/EIEC (Kaper et al., 2004; Lan et al., 2004; Pettengill et al., 2016).

The pathogenesis of *Shigella*/EIEC pathotype is based on their capacity to reach and invade colonic epithelial cells, leading to intracellular multiplication and spread to adjacent cells with consequent cell death. The major genes that facilitate invasion and spread of *Shigella*/EIEC into human macrophages and enterocytes are encoded by a large virulence plasmid (Michelacci et al., 2015). This virulence plasmid contains the conserved 30kb *mix-spa* locus, which encodes the components of the type three secretion system (T3SS) and its translocated effectors, such as Vir, Osp, Ipa Ipg and ShET2 (The et al., 2016). Several other virulence-related genes (VRGs) are

located on the pathogenicity island of the chromosome and these genes encode proteases (Pic and SigA), factors involved in iron acquisition (IucABDC and IutA), O-antigen conversion, antibiotic resistance and the *Shigella* enterotoxin ShET1 (Hazen et al., 2016).

Given major gaps in our understanding of *Shigella*/EIEC burden in the Brazilian semiarid region, investigating its pathobiology is needed. This region is one of the poorest areas from Brazil, with precarious sanitation and low socioeconomic status (Mendes et al., 2013). This study aimed to correlate *Shigella*/EIEC VRGs with clinical symptoms, nutritional status and copathogens of pathotype infections in a case-control study of diarrhea in children from Brazilian semiarid region. In order to evaluate virulence in *Shigella*/EIEC infection, we developed an unprecedented and broad multiplex PCRs panel that is able to detect 28 virulence genes.

2. METHODS

2.1 Study design and Ethical clearance

A cross-sectional case-control study was conducted in six cities (states) from the Northeast Region of Brazil: Cajazeiras (Paraíba), Crato (Ceará), Ouricuri (Pernambuco), Patos (Paraíba), Picos (Piauí) and Sousa (Paraíba). These cities have over 50.000 inhabitants each and represent the Brazilian semiarid region.

Health workers collected fecal samples from children between 2-36 months old in health care units or during active surveillance from April 2010 to March 2011. The study had the following inclusion criteria for diarrhea case: (1) Have three or more liquid stools in the last 24 hours; (2) Are not hospitalized at health facilities for more than 12 hours; (3) Do not transfer from another hospital; and (4) Provide written consent. Criteria for inclusion of controls: (1) Do

not present diarrhea in the two weeks; and (2) Provide written consent. Demographic and socioeconomic informations, as well as breastfeeding status, were collected from each child.

A total of 1200 participants (596 cases and 604 controls age and gender matched) were included in the project and tested for a screening of seventeen enteropathogens. This screening was performed using the Luminex Bioplex[®] System technology (Bio-Rad, California, USA) which detects different panels of enteropathogens such as: virus panel (RVA, norovirus, astrovirus, and sapovirus) [Liu et al., 2011]; bacteria panel 1 (pathogenic *Escherichia coli*) [Taniuchi et al., 2013]; bacteria panel 2 (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp., and *Vibrio* spp.) [Liu et al., 2012]; and protozoa panel (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica*) [Taniuchi et al., 2011]. After this initial screening, 148 samples were considered screened positive for *Shigella*/EIEC DNA, being 70 cases and 78 controls. These 148 fecal samples were stored at -80°C for further studies.

This research was approved by the National Commission on Ethics in Research of Brazil and the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (craft no. 550/2006, protocol no. 238/05). Parents or guardians of the children provided written informed consent during fecal specimen collection.

2.2 Clinical and nutritional evaluation

Clinical information (dehydration, fever, vomiting, abdominal pain, inquietude, weakness, abdominal pain, respiratory symptoms, mucous and bloody stools) of children was collected from the cases children. This careful evaluation was based on procedures done by previous large multicenter study of diarrhea etiology in children from developing countries (The MAL-ED Network investigators, 2014). Standardized questionnaire was applied by previously trained clinical staff when interviewing the parents or guardians of the children. In addition,

weigh, length and head circumference were collected for calculation of the following anthropometric z-scores: the weight-for-age (WAZ), height-for-age (HAZ), weight-for-length (WLZ), BMI for age (BAZ) and head circumference (HCZ) z-scores (WHO, 2006)

2.3 Fecal DNA reextraction and *Shigella*/EIEC molecular detection

Fecal DNA were reextracted from 600 µL of 20% stool suspension using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and quantity were checked by a spectrophotometric method (NanoDrop 2000, ThermoFischer Scientific, Massachusetts, USA). Extracted DNA was stored at -20°C until further use.

The *Shigella*/EIEC pathotype detection was performed by gene amplification of invasion plasmid antigen (*ipaH*) in a single PCR which was performed using GoTaqGreen (Promega, São Paulo, Brazil). This method was chosen in order to provide PCR positive samples that would be more specific for the detection of virulence genes by the same technique.

The PCR conditions were one cycle for 5 min at 95 °C; 40 cycles for 30s at 95 °C, 30s at 60 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension step for 10 min at 72 °C in a thermal cycler (Bio-Rad Laboratories). Bands were visualized and photographed (ChemiDoc XRS; Bio-Rad Laboratories) after electrophoresis of an ethidium bromide-stained 2% agarose gel in 1x Tris-acetate-EDTA-buffer. Primers used are described in **Table 1**. Only the presence of the correctly size PCR product was interpreted as a positive result. For this uniplex it was used DNA from the *Shigella flexneri* 2a strain 301 as positive control and autoclaved Milli-Q water was used as a negative control.

2.4 Detection of virulence-related genes

The positive DNA fecal samples for *Shigella*/EIEC were screened by PCR multiplex for the presence of 28 virulence-related genes (VRGs) (**Table 1**). In order to identify these 28 VRGs, four multiplex PCRs were developed in this study and three multiplex PCRs additional previously described (MEDEIROS et al., 2017) were also used, where specific markers were sought among the nucleotide sequences of *Shigella* and EIEC available in GenBank (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) (**Table 1**).

New primers pairs were designed by Oligo Perfect Designer software (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) and was synthesized by Invitrogen, São Paulo, Brazil, considering similar melting temperatures. Primer quality, including GC content, secondary structure, hetero- and homodimer formation, and off-target indentities were analyzed using OligoAnalyzer version 3.1 software (Integrated DNA Technologies, Illinois, USA). A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, Bethesda, Maryland, USA) search against the GenBank nucleotide database was used to confirm target specificity. Prior to testing and optimization, all primers pair were evaluated by uniplex reactions with their respective positive controls.

After optimization, each mPCR tube contained a 25- μ L reaction mixture comprising 12.5 μ L of master mix (Qiagen Multiplex PCR kit, Qiagen, California, USA), 2.5 μ L of Q-solution (Qiagen, California, USA), and 2.0 μ L of DNA, in addition to primers and water. PCR products were separated by electrophoresis on ethidium-bromide-stained 2% agarose gels and photographed (Chemidoc XRS, Bio-Rad Laboratories, California, USA). The following bacterial reference strains were used as positive controls: *Shigella flexneri* 2a 301 (*ipaH*, *ipaA-D*, *set*, *sen*, *ial*, *virB*, *virF*, *icsA*, and *icsB*, *virA*, *ipgD*, *iucB*, *iutA*, *ospB*, *ospG*, *ipaH7.8*, *ipaH9.8*, *ipgB1*, *ipgB2*, *ospF*, *ospC1*, *shiA*), enteroaggregative *Escherichia coli* H223-1 (*sigA*, *pic*, and *sepA*), and

enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 (*stx*). Autoclaved Milli-Q water was used as a negative control.

2.5 Statistical analysis

Data were typed into Excel spreadsheet v. 4.0 (Microsoft Corp., Seattle, WA) by two independent data enter persons and then checked through the intersection of these worksheets. Statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science v. 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). For the qualitative variables, chi-square test or Fisher's test was used. Graph Pad Prism software version 6.00 for Windows (San Diego, California, USA) was used for complementary statistical analysis, table formatting and figures. Z-scores were calculated by EpiInfo software v. 6.0 (Center for Disease Control, Atlanta, GA) using the World Health Organization Multi-Country Growth Reference Study (WHO, 2006).

In order to investigate correlations between clinical manifestations and copathogens combinations, Classification and Regression Tree Analysis (CART, Salford Systems, USA) was employed. This approach constructed models in stepwise fashion that show combinations of factors most strongly associated with symptoms. The odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) are shown to assess for the risk found between a variable and the outcome analyzed. The significance level of <0.05 was used in the statistical analysis.

3. RESULTS

3.1 Molecular detection of *Shigella*/EIEC pathotype

The *Shigella*/EIEC pathotype was detected in 5% (60/1200) of the total population by PCR. Of the *Shigella*/EIEC positive samples, 7.05% (42/596) were from children from case

group and 2.98% (18/604) were from control group. The presence of *Shigella*/EIEC was associated with diarrhea – cases definition ($p = 0.0013$; OR = 2.47 and 95% CI = 1.4 to 4.3).

3.2 Characterization of *Shigella*/EIEC positive population

Among the 60 *Shigella*/EIEC positive children, majority were male (61.3%, 37/60), were older than 12 months (76.6%, 46/60) (mean = 18.88 months and median = 19 months) and had mixed breastfeeding (91.6%, 55/60). Families of these children had monthly average income of US\$ 506.90 (equivalent to R\$ 1090.00 Brazilian currency) and almost all of their mothers had some degree of education (94.9%, 57/60), but none had complete graduation. Regarding sanitation conditions, 56.7% (34/60) of the children's household had suitable sanitation and 88.3% (53/60) had sanitary latrine at their household (**Table 2**)

Regarding clinical symptoms evaluation, low prevalence of clinical symptoms was observed – all of them being less than 50% observed. The highest prevalence was observed for dehydration (47.8%, 20/42), followed by vomiting and seizure (both 35.7%, 15/42). The lowest prevalence was observed for bloody stools (4.76%, 2/42) (**Table 3**). For the nutritional status analysis, it was not observed any statistical differences between scores mean of case and control group (**Table 1**).

3.3 *Shigella*/EIEC virulence-related genes distribution and correlation with clinics

The mPCR conditions for the amplification of VRGs were optimized for: 95°C for 15min; 35 cycles of 94°C for 45s, Ta for 45s (variable) and 72°C for 1min; and 72°C for 10min. Primer sequences and optimized annealing temperatures of each mPCR reaction are described in **Table 1**. **Figure 1** shows the electrophoresis gels of the new mPCRs developed in this study.

After optimization, these mPCR were used for detection of *Shigella*/EIEC VRGs in the fecal DNA samples positives for *Shigella*/EIEC.

Individual frequencies of each gene are given in **Table 4**. Results from amplification reactions of chromosomal and virulence plasmid-encoded genes showed that, the chromosomal gene encoding the aerobactin synthesis *iucB* was the most frequently detected (90%, 54/60), followed by *iutA* (83.3%, 50/60). Low prevalence rates were observed for plasmid-borne genes encoding TS33 effectors *ipgD* (26.6%, 16/60) and *ipaC* (21.6%, 13/60). Only one DNA fecal sample was negative for all 28 VRGs analyzed.

Considering VRGs distribution between case and control groups, genes *sen* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; 95% CI = 1.27 to 14.15), *ipgB2* ($p = 0.0267$; OR = 4.25; 95% CI = 1.27 to 14.15), *ospF* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; 95%CI = 1.12 to 11.9) and *ipgB1* ($p = 0.0354$; OR = 3.66; 95%CI = 1.12 to 11.9) were significantly associated with diarrhea (**Table 4**).

When analyzing whether VRGs were correlated with clinical symptoms associated with diarrhea, we found that fever was strongly associated with infection by *Shigella*/EIEC pathotype harboring *virA* gene ($p = 0.0005$; OR = 33; 95% CI = 1.79 to 608). Indeed, all children who reported fever were infected with *virA* positive pathotype (100%, 16/16). Further investigation using CART analysis of VRGs combinations that could be associated with clinical symptoms did not show any significant findings. The *virB* gene was associated with the lower 25th percentile of HAZ values ($p = 0.0275$; OR = 7.11, 95% CI = 1.422 to 36.7) regardless of the presence of diarrhea and this finding was not significant when analyzing only children without diarrhea.

3.4 *Shigella*/EIEC and coenteropathogens subclinical and clinical enteric infection

From the total *Shigella*/EIEC positive samples, 91.6% (55/60) were positive for at least one other enteropathogen. The highest prevalence was observed for the coinfection with

enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) (43.3%, 26/60), followed by *Salmonella* spp. (40%, 24/60). The lowest prevalence was observed for coinfections with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), adenovirus and norovirus (all 1.66%, 1/60). No coinfection was observed with *Entamoeba* spp. Regarding the distribution of coinfections between case and control groups, both had high prevalence rates of coinfections: 92.8% (39/42) and 88% (16/18) were positive for other enteropathogens in cases and controls, respectively (**Table 5**).

In order to verify if there were any coinfection that could be associated with presence or absence of any clinical symptoms. This analysis suggested that the abdominal pain was associated with coinfection with *Salmonella* spp ($p = 0.0262$; OR = 5.75; 95% CI = 1.362 to 20.73). No single copathogen was significantly associated with diarrhea or any other clinical symptoms evaluated.

4. Discussion

This study evaluated *Shigella*/EIEC VRGs association with clinical symptoms, nutritional status and copathogens in children. We used a case-control study of diarrhea in children aging 2-36 months in the Brazilian semiarid region. This is the first time the burden of *Shigella*/EIEC is investigated in this region, which has the lowest income and highest social inequity (IPEA, 2015), and certainly accounts for the larger proportion of enteric infections burden in Brazil (Mendes et al., 2013). This study defined as cases children with community diarrhea, who not required hospitalizations. Despite classical studies have evaluated more severe infections that lead to hospitalizations, the burden of community diarrhea to children's health was recently highlighted in a large cohort of children from eight different countries - the MAL-ED network (PlattsMills et al., 2015).

Recent studies have supported the recognition of *Shigella*/EIEC as a single pathovar based on genomic analysis (Lan et al., 2004; Pettengill et al., 2016). Albeit taxonomic revisions may be difficult, Pettengill and colleagues support that this change would improve outbreak characterizations and communication in the long-term (Pettengill et al., 2016). Accordingly, the use of *ipaH* gene positive criteria for detecting *Shigella*/EIEC pathogens has been already observed in some recent important studies of enteric infections etiology (PlattsMills et al., 2017; Liu et al., 2016). Further, metagenomic sequencing supported this approach, indicating that genetic sequences from these samples are similar to those classically identified as *Shigella* (Liu et al., 2018).

Shigella/EIEC pathotype was associated with diarrhea in a large multicenter case-control study of moderate to severe diarrhea in Africa and Asia (Liu et al., 2016). Corroborating to this finding, the present study showed association between *Shigella*/EIEC positive samples and diarrhea in the Brazilian semiarid region. Altogether these data reinforce the importance of *Shigella*/EIEC pathovar in enteric infections and support molecular diagnosis use, as well as alerts for the need for vaccine development (Kotloff et al., 2017). Of note, the complete characterization of diarrhea etiology in the study population has been addressed separately (Lima et al., 2018 - manuscript in submission).

Several attempts to understand *Shigella* pathobiology using virulence genes detection in clinical samples have been made (Casabonne et al., 2016; Nave et al., 2016; Ranjbar et al., 2017). In Brazil, a few studies were performed, but just a few VRGs were evaluated (Cruz et al., 2014; Silva et al., 2014; Souza et al. 2013). Recently, we applied a 16 VRGs diagnostic panel for *Shigella* spp. isolated from children with moderate to severe diarrhea in Fortaleza, a city in northeastern Brazil (Medeiros et al., 2017). In this study, we expanded the detection panel to 28

VRGs and applied it in a larger case-control study of community diarrhea at the Brazilian semiarid region. Remarkably, some VRGs had not been previously detected in clinical surveys: *ipgB1*, *ipgB2*, *ospF*, *iutA*, *ospB*, *ospG*, *ipaH7.8*, *ipaH9.8*, *ospC1*, *shiA* (Mattock et al., 2017). While genomic approaches are the gold standard, the use of broader PCR panels of genetic markers that cover diverse microbial virulence strategies must contribute to a more complete understanding of the pathobiology in the *Shigella*/EIEC clinical enteric infection.

In this study, four different genes were associated with diarrhea: *sen*, *ipgB1*, *ipgB2* and *ospF*. The *sen* gene, which encodes *Shigella* enterotoxin 2 – SheT2, has been previously associated with bloody diarrhea in children from Brazil and Iran (Cruz et al., 2014; Yaghoubi et al., 2017) (**Figure 2**). Other studies have shown high prevalence rates of *sen* gene in isolates associated with diarrhea (Zhang et al., 2014). Thus, our findings confirm *sen* gene as major contributor of severe *Shigella*/EIEC infections in the study population. Of note, the three other genes, *ipgB1*, *ipgB2* and *ospF*, were for the first time associated with diarrhea. IpgB1 and IpgB2 are both effectors secreted by T3SS that promote cell invasion by modulating actin filament structures (Mattock et al., 2017) (**Figure 2**). Interestingly, it has been suggested that isolates harboring invasive genes are associated with the ability to cause diarrhea (Fan et al., 2017). OspF promote suppression of innate immune response in epithelial cells (Arbibe et al., 2007). Our data suggest these mechanisms might also play major roles on induction of diarrhea in the study population.

We further investigated whether specific VRGs could correlate with clinical severity of diarrhea, defined by the presence of fever, abdominal pain, vomit and bloody stools. The only gene was *virA*, which showed significantly association with children presenting fever. VirA is an effector which degrades microtubules by means of cysteine protease-like activity, being critical

for intra and intercellular spreading (Yoshida et al., 2006) (**Figure 2**). Zhang and colleagues (2014) have detected *virA* gene in 100% of highly virulent strains and suggested the essential role for pathogenesis (Zhang et al., 2014). High prevalence rates of *virA* gene in children with diarrhea were reported (Lluque et al., 2015). Our results further corroborate VirA as a major virulence factor associated with clinical severity of diarrhea.

In addition to assess VRGs associations with diarrhea with *Shigella*/EIEC pathotype, we evaluated correlation of genes with anthropometric z-scores. *Shigella* has been shown to associate with decreased linear growth in children from rural Bangladesh (Lee et al., 2014). Our findings show children infected with *Shigella*/EIEC harboring *virB* gene are associated with malnutrition. VirB is a major transcriptional activator, which regulates expression of *ipa*, *mxi* and *spa* virulence operons and consequently genes of the entry region (Mattock et al., 2017). This is the first study that associated a specific *Shigella*/EIEC genetic marker with malnutrition. Interestingly, we observed high rates of VRGs in children without diarrhea, albeit less than in diarrheal cases for all VRGs. A previous study in children from India showed similar findings (Ghosh et al., 2014). Subclinical enteric infections have been recently associated to growth impairment and intestinal inflammation in children from developing countries (MAL-ED Network Investigators et al., 2017). Further studies are necessary to investigate whether specific microbial virulence factors might play a role on these silent consequences.

The high rates of copathogens of *Shigella*/EIEC infections in children from the study population is in agreement with high environmental contamination reported in these settings (Mendes et al., 2013). In addition, the potential harmful consequences of coinfections have been suggested by several studies although little is known about which coinfection combinations may be more clinically important (Liu et al., 2016; Lima et al., 2017). EAEC was the most prevalent

copathogen in the study and further corroborates previous studies on etiology of enteric infections in children (PlattsMills et al., 2015; Lima et al., 2017). In this study, the presence of *Salmonella* spp. was associated with *Shigella*/EIEC infected children presenting abdominal pain. *Salmonella* spp. is also one of the most important causes of bacterial diarrhea worldwide (Majowicz et al., 2010; Tadesse, 2014). These pathogens share similar pathogenesis mechanisms (Dekker; Frank, 2015; Mama; Alemu, 2016) and might act in synergism for causing disease.

This study has some limitations. The use of bacterial isolates would provide more precise results. Some virulence genes might be shared by other Enterobacteriaceae and cannot be interpreted as from single bacteria. Moreover, the small sample size hampered the possibility of more robust analysis.

In conclusion, we developed a broad PCR panel of VRGs that can be further applied in other settings and help understanding *Shigella*/EIEC virulence factors. This study further corroborates *Shigella*/EIEC as a major enteric pathotype associated with diarrhea in children from Brazilian semiarid region, and suggests the T3SS effectors ShET2, IpgB1, IpgB2 and OspF as major contributors for this outcome (**Figure 2**). Moreover, the effector VirA was associated with diarrhea-associated fever, while VirB was associated with lower values of HAZ (**Figure 2**). Coinfection with *Salmonella* spp. may be indicator of more severe *Shigella*/EIEC infections. Altogether these data corroborate better understanding of *Shigella*/EIEC pathobiology.

5. References

- LIU, J. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **Lancet**, v. 388, p.1291–301, 2016.
- MAURELLI, A.T. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host– parasite interactions. **Escherichia Coli**, p. 215-245, 2013.
- PUPO, G.M.; LAN, R.; REEVES, P.R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10567-10572, 2000.
- LAN, R. et al. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n.10, p. 6303–6309, 2001.
- JIN Q, YUAN Z, XU J, ET AL. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 4432–4441, 2002.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 2, p.140-148, 2003.
- LAN, R. et al. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p. 5080–5088, 2004.
- PENG, J.; YANG, J.; JIN, Q. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p.147-152, 2009.
- YANG, J. et al. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella* spp. **Journal of Molecular Evolution**, v. 64, n. 1, p. 71-79, 2007.
- PETTENGILL, E.A.; PETTENGILL, J.B.; BINET, R. Phylogenetic analyses of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* for the identification of molecular epidemiological markers: Whole-genome comparative analysis does not support distinct genera designation. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2016.
- KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- MICHELACCI, V. et al. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, p.287e.11-287e.19, 2015.
- THE, H.C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235-250, 2016.
- HAZEN, T.H. et al. Investigating the relatedness of enteroinvasive *Escherichia coli* to other *E. coli* and *Shigella* isolates by using comparative genomics. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p.2362-2371, 2016.

MENDES, P.S.; RIBEIRO, H.D.A.C.; MENDES, C.M. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **Journal Pediatrics**, v. 89, n. 3, p. 315-25, 2013.

Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, Taniuchi M, Gratz J, Toney D, Kang G, Houpt E. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J Clin Virol* (2011) 50:308–313. doi: 10.1016/j.jcv.2010.12.009 PMID: 21256076.

Taniuchi M, Sobuz SU, Begum S, Platts-Mills JA, Liu J, Yang Z, Wang XQ, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. *J Infect Dis* (2013) 208:1794–1802. doi: 10.1093/infdis/jit507 PMID: 24041797.

Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, Howlader AM, Sobuz SU, Haque R, Talukder KA, Qureshi S, Zaidi A, Haverstick DM, Houpt ER. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. *J Clin Microbiol* (2012) 50:98–103. doi: 10.1128/JCM.05416-11 PMID: 22075596.

Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout LV, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites. *Am J Trop Med Hyg* (2011) 84: 332–337. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0461 PMID: PMC3029193.

The MAL-ED Network. The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 9, p. S193-206.

World Health Organization, 2006. WHO Child Growth Standards: Methods and development: Length/height-for-age, Weight-for-age, Weight-for-length, Weight-for-height and Body Mass Index-for-age. World Health Organization, Geneva, Switzerland (http://www.who.int/childgrowth/publications/technical_report_pub/en/ accessed July 23, 2013).

MEDEIROS, P.H.Q.S. et al. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 1-8, 2017.

IPEA (Institute of Economic and Applied Research). Brazilian semi-arid and regional policies: the case of the Northeast Financing Constitutional Fund (FNE), Research report, Brasília, 2015. Accessed February 20, 2018.

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, p. 1-12, 2015.

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6 – 23 mo in Bangladesh: a case-control study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n. 105, p. 1132–1138, 2017.

LIU J. et al. Direct detection of *Shigella* in stool specimens by use of a metagenomic approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, p. 1-8, 2018.

KOTLOFF, K. L. et al. Shigellosis. **The Lancet**, p. 1-12, 2017.

Lima AAM, Oliveira DB, Quetz JS, et al. Etiology, clinical severity and environmental factors associated with diarrheal diseases in infants at semiarid region in Brazil: a case-control study. In Submission. Corresponding author: Aldo AM Lima, PhD, E-Mail: alima@ufc.br; Phones: 55 085 3366 8445 Or -8437.

CASABONNE, C. et al. Prevalence and virulence factors of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in Rosario, Argentina. **Japanese journal of infectious diseases**, p. 1-18, 2016.

NAVE et al. Distribution of genes encoding virulence factors and molecular analysis of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea in Kerman, Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 68-71, 2016.

RANJBAR, R. et al. Virulotyping of *Shigella* spp. Isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 2017.

CRUZ, C.B.N. et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **Biomed Research International**, p. 1-9, 2014.

SILVA, T. et al. Characterization of *Shigella* spp. By antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 731-733, 2008.

SOUSA, M.A.B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhea prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30-35, 2013.

MATTOCK, E.; BLOCKER, A.J. How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 64, p.1-24, 2017.

YAGHOUBI, S. et al. Profiling of Virulence-associated factors in *Shigella* species isolated from acute pediatric diarrheal samples in Tehran, Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 8, p. 220-226, 2017.

ZHANG et al. Epidemic and virulence characteristic of *Shigella* spp. with extended-spectrum cephalosporin resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 260, p. 1-9, 2014.

FAN, W. et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. **Gut Pathogens**, v. 9, p. 2017.

ARBIBE, L. et al. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat. Immunol.* 8, 47–56. doi: 10.1038/ni1423, 2007.

YOSHIDA, S. et al. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. *Science*, v. 314, p. 985–989, 2006.

LLUQUE, A. et al. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in *Shigella* strains from periurban areas of Lima (Peru). *International Journal of Medical Microbiology*, p. 1-11, 2015.

GOSH, S. et al. Genetic characterization of *Shigella* spp. Isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. *Journal of Medical Microbiology*, v. 63, p. 903-910, 2014.

MAL-ED Network Investigators. Relationship between growth and illness, enteropathogens and dietary intakes in the first 2 years of life: findings from the MAL-ED birth cohort study. *BMJ Global Health*, v. 28, n.2, p. 1-10, 2017.

LIMA, A. A. M. et al. Enteroaggregative *E. coli* subclinical infection and co-infections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 66, n. 2, p. 325-333, 2017.

MAJOWICZ, S.E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Disease*, v. 50, p. 882-889, 2010.

TADESSE, G. Prevalence of human Salmonellosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Disease*, v. 14, 2014.

DEKER, J. FRANK, K. *Salmonella, Shigella* and *Yersinia*. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 35, p. 225-246, 2015.

MAMA, M. ALEMU, G. Prevalence antimicrobial susceptibility patterns and associated risk factors of *Shigella* and *Salmonella* among food handlers in Arba Minch University, South Ethiopia. *BMC Infectious Disease*, v. 16, 2016.

Table 1. PCR primers, amplifications conditions, and expected PCR products for *Shigella*/EIEC genes

Table 2 - Characterization of the studied population and parenteral informations from 60 *Shigella*/EIEC positive children.

Table 3 – Prevalence of clinical manifestation of children case

Table 4 – Prevalence of virulence-related genes in stool samples from case and controls children positive to *Shigella*/EIEC

Table 5 – Prevalence of co-infections in children with *Shigella*/EIEC. EPEC - enteropathogenic *E coli*; EAEC - enteroaggregative *Escherichia coli*; EIEC - enteroinvasive *E coli*; ETEC - enterotoxigenic *E coli*; STEC - Shiga-toxin-producing *E coli*.

Fig 1. Agarose gel separation of mPCR products of VRG developed in this study

Fig 2. Pathogenicity model of *Shigella*/EIEC infection highlighting T3SS effectors contributors for outcome of the present study

For all PCR conditions, an initial denaturation step (5 min for single PCR and 15 min for multiplex PCR at 95 °C) and a final extension step (10 min at 72 °C) were performed in a MyCycler thermocycler (Bio-Rad). F, Forward; R, Reverse.

Target genes description (GenBank accession number)	Primer sequence (5' – 3')	Amplicon size (pb)	Annealing temperature	Reference
Diagnostic gene				
<i>ipaH</i> – invasion plasmid antigen H (HE616529.1)	F: TGGAAAACTCAGTGCCTCT R: CCAGTCCGTAAATTCATTCT	422	60 °C	Luscher and Altwegg, 1994
Virulence genes				
PROFILE A – MULTIPLEX 1				

<i>sen-</i> enterotoxin ShET2 (Z54211.1)	F: ATCTCCTTGAGGCCAGCAAA R:GGAAGGAATGGGAGGACGAA	296	58 °C	Medeiros et al., 2017
<i>sigA-</i> <i>Shigella</i> IgA-like protease (NC_004337)	F: CCGACTTCTCACTTTCTCCCGCC R: ATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	430		Boisen et al, 2009
<i>pic-</i> protein involved in colonization (U35656.1)	F:ACTGGATCTTAAGGCTCAGGA T R:GACTTAATGTCACTGTTCAGC G	570		Restieri et al., 2007
<i>sepA-</i> <i>Shigella</i> extracellular protease (Z48219.1)	F:GCAGTGGAAATATGATGCGGC TT R:G TTCAGATCGGAGAAGAACG	794		Restieri et al., 2007
PROFILE B – MULTIPLEX 2				
<i>icsA</i> – actin polimerização (AF336770.1)	F: CCAACCCCTCTCATGCAT R: ATCACCAGCACCACCATGAC	83	60 °C	Medeiros et al., 2017
<i>stx</i> –Shiga toxin (X07903.1)	F: TTCTGGGAAGCGTGGCATTA R: CATCAGAATTGCCCCCAGAG	167		Medeiros et al., 2017
<i>icsB-</i> prevention of autophagic recognition of	F: GGCCTGCATCAAGTCTTTTCG R: GGCATCGGTACAGCCAAAAA	280		Medeiros et al., 2017

<i>icsA</i> (M86530.1)				
<i>virB</i> - regulator de <i>ial</i> (CP001384.1)	F: CGCGCGAGACAGATTCTCTT R: TGGTGGATTTGTGCAACGAC	488		Medeiros et al., 2017
PROFILE C – MULTIPLEX 2				
<i>ipaC</i> - invasion plasmid antigen C (AF386526.1)	F:CCTCACCCACAAACTAACTCTA GCA R:AGAAGTTTTATGTTTCAGTTGA CAGGGATA	93	60 °C	Boisen et al., 2009
<i>ipaB</i> - invasion plasmid antigen B (X60777. 1)	F: CAAGCCCTGAATCCGATCAT R: TGCTGCTGCCTGTTTACCAA	204		Medeiros et al., 2017
<i>ipaD</i> - invasion plasmid antigen D (AF386526.1)	F: AAGAAGCCGAGCTTGATGGAG R: CCTCGCCATTTCCACCTAGA	450		Medeiros et al., 2017
<i>ipaA</i> - invasion plasmid antigen A (CP000039.1)	F: CCTGTGTCCCCGAGAAAGAGA R: TGACGCACAGGCAAAACTTG	628		Medeiros et al., 2017
PROFILE D – MULTIPLEX 2				
<i>ipgD</i> - invasion plasmid gene D	F: GAAACCGGAAAGCACAAAGG	149	60 °C	This study

(AF386526.1)	R: CTGTCACGCGCAAACAAAAG			
<i>iucB</i>	– F: CCTCCTGTTCTGCTTCACC			This
aerobactin	R: TGACGGCCTTGTAAGCTCAA	270		study
synthesis				
(AY277720.1)				
<i>iutA</i> – complex	F:AGTATATGCCCCGGGCTCTT	528		This
siderophore-	R: CAATGCGCTCATCGTGATCT			study
iron receptor				
(AE005674.2)				
<i>virA</i> -	F:AAGCCCTTCACTGCTTGGAA	702		This
microtubule	R: ACTCACAAGCCTGCACCAGA			study
desestabilization				
(AF386526.1)				
PROFILE E – MULTIPLEX 2				
<i>ospB</i> -	outer F:TTCTTGGGCACGGTAGTCCT	185	60 °C	This
<i>Shigella</i> protein	R: ACTTTCAGCAGGGGCATTGT			study
B				
(AF386526.1)				
<i>ospG</i> -	F:AGTAACGGAGCCCATTCTCG	230		This
inhibition of	R: GCAGCATTCGGAGGTACACA			study
NFκB				
activation				
(AF386526.1)				
<i>ipaH7.8</i> -	F:ACCACGGCCCACAGATTTAC	387		This
Macrophage	R: AAAGGCCTTCTGATGCCTGA			study
pyroptosis				
promotion				

(AF386526.1)				
<i>IpaH9.8</i> - inhibition of NFκB activation	F:CTGCCAGCTTTACCCGATTC R: AAAGGCCTTCTGATGCCTGA	691		This study
(AF386526.1)				
PROFILE F – MULTIPLEX 2				
<i>ipgB2</i> - invasion plasmid B2	F:CCGCTGTACAATGGGGAAAA R: TTGGTTTACCACCCGGGATA	151	60 °C	This study
(AF386526.1)				
<i>ospF</i> - outer <i>Shigella</i> protein F	F:GCATCGAACGTGCCAACTTA R: CCCACACGAGATTGCTGAGA	284		This study
(AF386526.1)				
<i>ipgB1</i> - invasion plasmid B2	F:CCTCGCCCATCATTTGATTC R: TTTGCTCTGAGGCCAGATGA	404		This study
(AF386526.1)				
<i>ospC1</i> - outer protein C1	F:GATGCACCATCAGACGCTAAA R: CAGATCCACAGGGGCAAGAT	675		This study
(AF386526.1)				
PROFILE G – MULTIPLEX 3				
<i>shiA</i> - shiA like inflammation suppressor	F:CTGTGTGGCATGACTTCTCC R: CAGGTGCTCCTGCTGTCTTA	227	57 °C	This study
(AE005674.2)				

<i>ial-</i> invasion- associated loci (CP001384.1)	F: CTGGATGGTATGGTGAGG R: GGAGGCCAACAATTATTTCC	320	Frankel et al., 2009
<i>set-</i> enterotoxin ShET1 (Z47381.1)	F: TCCCTTCATACTGGCTCCTG R: AACACTCTGTGGGGGAACAG	553	Farfan et al., 2010
<i>virF-</i> <i>virB</i> regulator (AY206433.1)	F: GCTCAGGCAATGAACTTTGAC R: TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	618	Vidal et al., 2005

All primers concentrations were 0.1 $\mu\text{mol/L}$, except for *iutA* that was 0.5 $\mu\text{mol/L}$.

Parameters	Total N = 60 (%)
Gender	
Masculino	37 (61.3%)
Feminino	23 (38.3%)
Age (months)	
> 2 < 6	2 (3.33%)
> 6 < 12	12 (20%)
> 12 < 24	25 (41.6%)
> 24 < 36	21 (35%)

Breastfeeding status	
Exclusive breastfeeding	0%
Mixed breastfeeding	27 (45%)
No breastfeeding	5 (8.33%)
Family monthly income (of minimum wages)	
$\leq \frac{1}{2} \leq 2$	54 (90%)
$2 \leq 5$	5 (8.33%)
≥ 5	1 (1.67%)
Maternal education degree	
None degree	3 (5%)
Some degree	57 (94.9%)
Graduated	0 (0%)
Sanitation conditions	
Suitable sanitation	34 (56.7%)
Public sewage	20 (33.3%)
No sewage	6 (10%)
Presence of sanitary latrine	
Yes	53 (88.3%)
No	7 (11.7%)

Clinical manifestation	Case N = 42 (%)
Dehydration	20 (47.6)
Fever	16 (38.1)
Vomiting	15 (35.7)
Inquietude	15 (35.7)
Weakness	14 (33.3)
Abdominal pain	11 (26.2)
Cough or other respiratory symptoms	10 (23.8)
Mucous stools	8 (19)
Bloody stools	2 (4.76)

VRGs	Cases N = 42 (%)	Controls N = 18 (%)	Total N = 60 (%)	P value	OR	95% CI
<i>sen</i>	34 (80.9%)	9 (50%)	43 (71.6%)	0.0267*	4.25	1.27 – 14.15
<i>sigA</i>	31 (73.8%)	11 (61.1%)	42 (70%)	0.3669	1.79	0.55 – 5.87
<i>pic</i>	21 (50%)	9 (50%)	30 (50%)	1.0000	1.00	0.33 – 3.01
<i>sepA</i>	19 (45.2%)	7 (38.8%)	26 (43.3%)	0.7785	1.30	0.42 – 4.00
<i>icsA</i>	29 (69%)	10 (55.5%)	39 (65%)	1.0000	1.09	0.34 – 2.96
<i>stx</i>	0 (0%)	1 (5.5%)	1 (1.67%)	0.3000	0.13	0.005 – 3.55

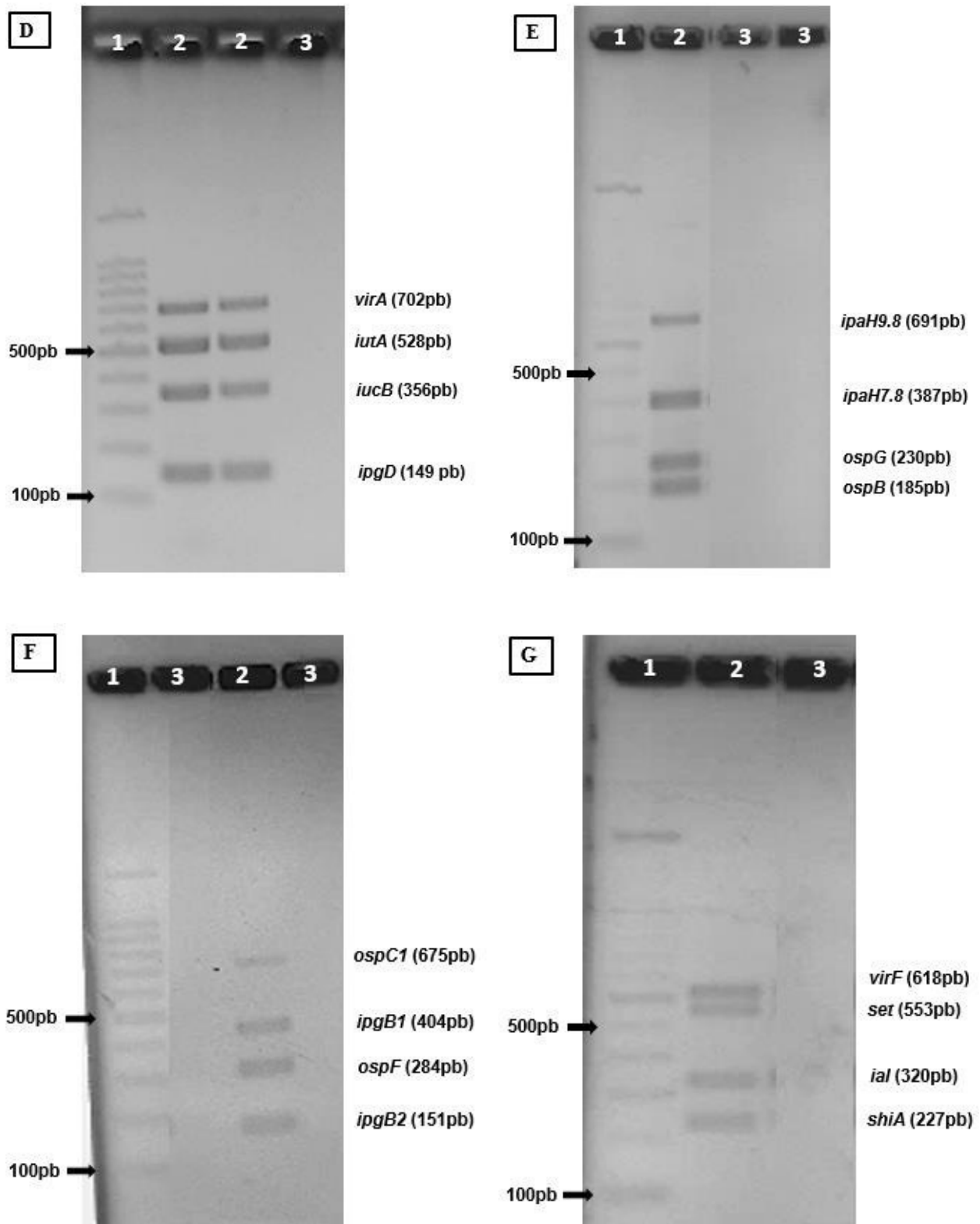
<i>icsB</i>	31 (73.8%)	11 (61.1%)	42 (70%)	0.3669	1.79	0.55 – 5.87
<i>virB</i>	31 (73.8%)	11 (61.1%)	42 (70%)	0.3669	1.79	0.55 – 5.87
<i>ipaC</i>	12 (28.6%)	1 (5.5%)	13 (21.6%)	0.0841	6.80	0.81 – 56.9
<i>ipaB</i>	26 (61.9%)	8 (44.4%)	34 (56.7%)	0.2614	2.03	0.66 – 6.22
<i>ipaD</i>	17 (40.5%)	6 (33.3%)	23 (38.3%)	0.7734	1.36	0.43 – 4.33
<i>ipaA</i>	16 (38.1%)	2 (11.1%)	18 (30%)	0.0629	4.92	0.99 – 24.3
<i>ipgD</i>	12 (28.6%)	4 (22.2%)	16 (26.6%)	0.7549	1.40	0.38 – 5.12
<i>iucB</i>	40 (95.2%)	14 (77.7%)	54 (90%)	0.0602	5.71	0.94 – 34.7
<i>iutA</i>	38 (90.5%)	12 (66.6%)	50 (83.3%)	0.0524	4.75	1.14 – 19.7
<i>virA</i>	29 (69%)	8 (44.4%)	37 (61.6%)	0.0887	2.78	0.89 – 8.69
<i>ospB</i>	26 (61.9%)	8 (44.4%)	34 (56.6%)	0.2614	2.03	0.66 – 6.22
<i>ospG</i>	27 (64.3%)	10 (55.5%)	37 (61.6%)	0.5712	1.44	0.46 – 4.43
<i>ipaH7.8</i>	34 (81%)	10 (55.5%)	44 (73.3%)	0.0580	3.40	1.01 – 11.3
<i>ipaH9.8</i>	28 (66.6%)	8 (44.4%)	36 (60%)	0.1517	2.50	0.80 – 7.73
<i>ipgB2</i>	34 (80.9%)	9 (50%)	43 (71.6%)	0.0267*	4.25	1.27 – 14.1
<i>ospF</i>	33 (78.6%)	9 (50%)	42 (70%)	0.0354*	3.66	1.12 – 11.9
<i>ipgB1</i>	33 (78.6%)	9 (50%)	42 (70%)	0.0354*	3.66	1.12 – 11.9
<i>ospC1</i>	34 (80.9%)	10 (55.5%)	44 (73.3%)	0.0580	3.40	1.01 – 11.4
<i>shiA</i>	21 (50%)	7 (38.8%)	28 (46.6%)	0.5738	1.57	0.51 – 4.83
<i>ial</i>	33 (78.6%)	9 (50%)	42 (70%)	0.4047	1.73	0.58 – 5.13

<i>set</i>	24 (57.1%)	6 (33.3%)	30 (50%)	0.1581	2.66	0.84 – 8.46
<i>virF</i>	31 (73.8%)	9 (50%)	40 (66.6%)	0.1335	2.81	0.89 – 8.92

* Associated with cases, $P < 0.005$ by Fischer's exact test when compared to controls.

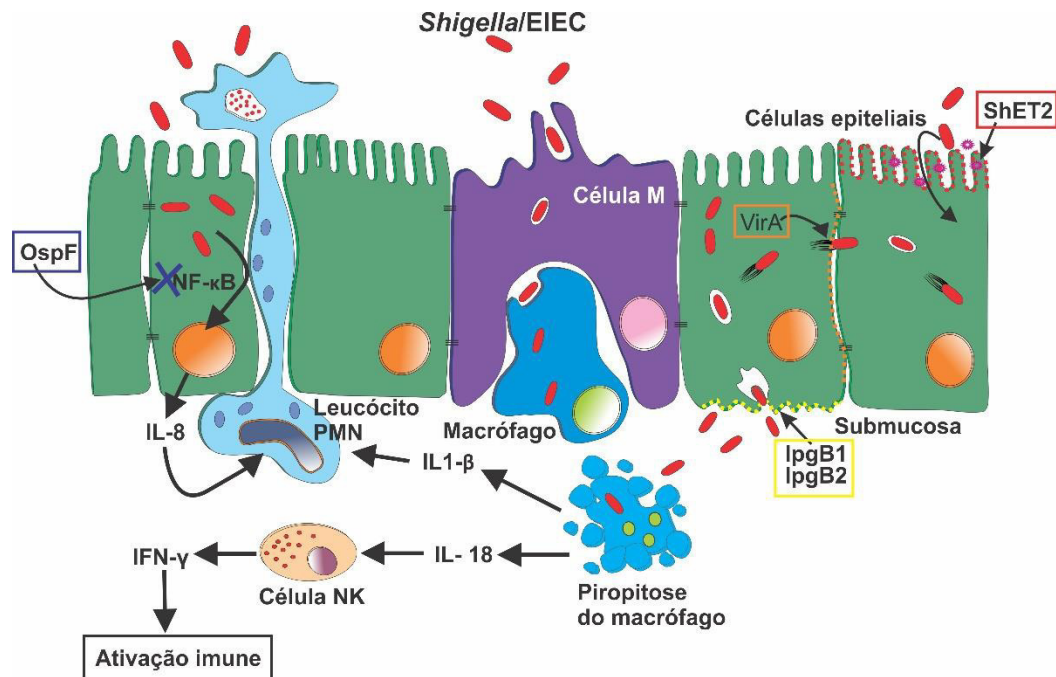
Co-pathogens	Cases	Controls	Total	P value
	N = 42 (%)	N = 18 (%)	N = 60 (%)	
EAEC	20 (47.6)	6 (33.3)	26 (43.3)	0.3979
EHEC	1 (2.38)	0 (0)	1 (1.66)	0.9999
EPEC	13 (30.9)	6 (33.3)	19 (31.6)	0.9999
ETEC	6 (14.3)	3 (16.6)	9 (15)	0.9999
Adenovirus	1 (2.38)	0 (0)	1 (1.66)	0.9999
Astrovirus	2 (4.76)	1 (5.55)	3 (5)	0.9999
Norovirus	1 (2.38)	0 (0)	1 (1.66)	0.9999
Rotavirus	2 (4.76)	0 (0)	2 (3.33)	0.9999
Sapovirus	1 (2.38)	1 (5.55)	2 (3.33)	0.5136
<i>Salmonella</i> spp.	14 (33.3)	10 (55.5)	24 (40)	0.1517
<i>Campylobacter</i> spp.	5 (11.9)	3 (16.6)	8 (13.3)	0.6863
<i>Aeromonas</i> spp.	2 (4.76)	3 (16.6)	5 (8.33)	0.1537
<i>Vibrio cholera</i>	1 (2.38)	2 (11.1)	3 (5)	0.2116
<i>Entamoeba</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.9999

<i>Cryptosporidium</i> spp	2 (4.76)	3 (16.6)	5 (8.33)	0.1537
<i>Giardia lamblia</i>	16 (38.1)	4 (22.2)	20 (33.3)	0.3705



1: 100- bp DNA ladder; 2: positive control 3: negative control. Numbers on the

left represent the size of the DNA control bands (base pairs). On the right there are the gens of each mPCR.



Modified from Schroeder and Hilbi (2008)

Supplementary material

Supplemental Table 1 – Z-scores means of cases and control children positives for *Shigella/EIEC*

Z-scores	Cases (n=42)	Controls (n=18)	Total (n= 60)	P value
HAZ ¹ (Mean ± DP)	-0.7110±1.475	-0.5411±1.765	-0.6592±1.555	0.4672
WAZ ² (Mean ± DP)	-0.1310±1.417	-0.3722±1.408	-0.2046±1.406	0.6662
WHZ ³ (Mean ± DP)	0.3045±1.854	-0.0661±1.518	0.1933±1.755	0.9515
BAZ ⁴ (Mean ± DP)	0.4400±1.874	-0.0116±1.616	0.3045±1.799	0.8322

HCZ ⁵ (Mean ± DP)	0.4812±1.997	0.3544±1.132	0.4432±1.773	0.7622
------------------------------	--------------	--------------	--------------	--------

¹ Height-for-age z-scores (HAZ), ² weight-for-age z-scores (WAZ), ³ weight-for-height z score (WHZ), ⁴ BMI-for-age z-scores (BAZ) ⁵ head circumference Z-scores (HCZ).