



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA VIRULÊNCIA E PERFIL DE  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *SHIGELLA* SPP ISOLADAS DE  
CRIANÇAS COM DIARREIA MODERADA A SEVERA NA CIDADE DE  
FORTALEZA-CE, BRASIL**

**FORTALEZA**

**2016**

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**Caracterização molecular da virulência e perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *shigella* spp isoladas de crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza-Ce, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima. Coorientador: Prof. Dr. Ila Fernanda Nunes Lima

**FORTALEZA, 2016**

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)

---

- Q71c Quintela Soares de Medeiros, Pedro Henrique.  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE SHIGELLA SPP ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DIARREIA  
MODERADA A SEVERA NA CIDADE DE FORTALEZA-CE, BRASIL / Pedro Henrique Quintela  
Soares de Medeiros. – 2016.  
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Shigelose. 2. Diarreia. 3. Virulência. 4. Resistência. I. Título.

CDD 616.9

---

**PEDRO HENRIQUE QUINTELA SOARES DE MEDEIROS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA VIRULÊNCIA E PERFIL DE  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *SHIGELLA* SPP ISOLADAS DE  
CRIANÇAS COM DIARREIA MODERADA A SEVERA NA CIDADE DE  
FORTALEZA-CE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 22/07/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Luís Carlos Rey  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À instituição financiadora do estudo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao professor doutor Aldo Ângelo Moreira Lima, pelos ensinamentos, pela oportunidade de conhecer sua linha de pesquisa e por dar a base para meu desenvolvimento científico.

Às crianças e famílias participantes do projeto, fisicamente distantes dos experimentos no laboratório, mas igualmente importantes para o resultado final.

À toda a equipe que realizou o trabalho fora do laboratório, seja na coleta de amostras ou aplicação de questionários.

Ao professor doutor Alexandre Havt, pela inspiração e ajuda científica essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À doutora Ila Fernanda Nunes Lima, pela idealização deste trabalho e diversos ensinamentos e orientações que me guiaram ao longo do desenvolvimento do mesmo.

Às professoras doutoras Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia e Marjorie Moreira Guedes pelas valiosas contribuições e carinho durante a banca de qualificação deste trabalho.

Ao Júnior e Quirino pela ajuda no desenvolvimento dos mapas e análise do banco de dados, respectivamente.

Ao professor Carlos Henrique Alencar, pela contribuição na análise geográfica.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, José, Kátia, Charles, Luciana, Charliene, Conceição e Teresinha, pelo apoio estrutural para a realização dos experimentos no laboratório.

Aos pesquisadores, doutorandos, mestrandos e graduandos do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), pelas discussões científicas, amizade e apoio nos momentos difíceis:

Delvane, Mara, Vinícius, Paloma, Ana Karolina, Lyvia, Herlice, Samilly, Rafaela, Rafhae....., Marília, Jeanine, Márcio, Tiago, Claudiane, Tamara, Alejandra, Jéssica e Pedro Mateus. Valeu, povo!

À Mariana Duarte Bona, pela ajuda imensurável e companheirismo em várias etapas desta pesquisa.

À Elana Figueiredo, pela ajuda na confecção deste trabalho escrito e apoio moral.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, compreensão e amor constante. Sem ela, nada disso seria possível.

“Não somos o que sabemos. Somos o que  
estamos dispostos a aprender.”

(Autor desconhecido)

## RESUMO

A shigelose constitui um importante problema de saúde pública mundial, principalmente na população infantil de países em desenvolvimento, devido a sua alta severidade clínica, inexistência de vacina e elevada taxa de resistência antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular da virulência e da resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de crianças com diarreia em Fortaleza, Ceará, Brasil. 63 cepas de *Shigella* spp. foram isoladas de fezes de crianças com diarreia moderada a grave entre 2008 e 2009 em Fortaleza. Os dados socioeconômicos e as manifestações clínicas das crianças com diarreia infantil foram coletados por meio de um questionário padronizado. A caracterização microbiológica convencional e o ensaio de imunoaglutinação foram utilizados para a classificação dos sorogrupos (*S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*). O material genético foi extraído e analisado em quatro reações de polimerase em cadeia múltipla, detectando 16 genes de virulência. Testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer, utilizando um painel de 13 antimicrobianos. Observou-se predominância de *S. flexneri* e *S. sonnei* (43%, n = 27 cada) na população, seguidas de *S. dysenteriae* (8%, n = 5) e *S. boydii* (6%, n = 4). Houve maior associação de *S. flexneri* com crianças com renda mensal familiar abaixo de um salário mínimo. *S. flexneri* foi também associada à maior quantidade de genes de virulência. Os genes de virulência *pic* (proteína associada à adesão a mucosa intestinal), *set* (enterotoxina 1) e *sepA* (proteína envolvida na invasão celular) isoladamente foram associados à *S. flexneri*. A presença do gene *sepA* foi associada à intensa dor abdominal. O fenótipo de resistência a pelo menos um fármaco foi observado em 96,8% dos isolados. A maior taxa de resistência foi para a combinação sulfametoxazol/trimetoprima (82,5%), seguida de tetraciclina (79,4%), ampicilina (60,3%) e cloranfenicol (47,6%). Observou-se associação estatística entre *S. flexneri* e resistência à ampicilina e ao cloranfenicol, e entre *S. sonnei* e resistência à azitromicina. A resistência a três ou mais fármacos antimicrobianos foi associada com *S. flexneri*. A presença dos genes *pic*, *set* e *sepA* foi associada à resistência a pelo menos três antimicrobianos. Um maior número de genes de virulência foi associado a cepas com resistência à maior quantidade de antimicrobianos. Em conclusão, a shigelose na população infantil de Fortaleza, Ceará, apresenta-se com proporções predominantes e similares de *S. sonnei* e *S. flexneri*, sendo esta última associada à intensa dor abdominal com o gene *sepA*, menor renda mensal familiar da criança, maior número de genes de virulência, presença dos genes *pic*, *set* e *sepA* e resistência a três ou mais antimicrobianos. O estudo sugere uma provável transição socioeconômica da população e alerta para a resistência a antimicrobianos comumente usados na prática clínica. Ademais, a resistência a determinados antimicrobianos foi sorogrupo-específica na shigelose e associada à maior virulência do micro-organismo.

**Palavras-chave:** Shigelose. Diarreia. Virulência. Resistência.



## ABSTRACT

Shigellosis is a major public health problem worldwide, mainly in children from developing countries, due to high clinical severity, lack of vaccine and high rates of antimicrobial resistance. The study aimed to perform molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance description of *Shigella sp.* strains isolated from children with diarrhea in Fortaleza, Ceará, Brazil. 63 *Shigella* spp. strains were isolated from stool children samples with moderate to severe diarrhea between 2008 and 2009 in Fortaleza. Socioeconomic and clinical data was collected through a standardized questionnaire. Microbiological characterization and immunoagglutination assay were performed for serogroups classification (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* and *S. boydii*). Genetic material was extracted and analyzed by four multiple polymerase chain reactions, detecting 16 virulence genes. Antimicrobial susceptibility tests were performed using Kirby-Bauer disk diffusion method, with a panel of 13 antimicrobials. A majority of *S. flexneri* (43%) and *S. sonnei* (43%) was observed, followed by *S. dysenteriae* (8%) and *S. boydii* (6%). *S. flexneri* was associated with family incomes below the minimum wage and with higher number of virulence genes detected. The virulence genes *pic* (protein associated with adhesion to intestinal mucosa), *set* (enterotoxin 1) and *sepA* (protein involved with cell invasion) were separately associated with *S. flexneri*. The presence of the *sepA* gene was associated with more intense abdominal pain. The resistant phenotype to at least one drug was observed in 96.8% of the isolates. The higher resistance rates were against sulfamethoxazol/trimethoprim combination (82.5%), followed by tetracyclin (79.4%), ampicilin (60.3%) and chloramphenicol (47.6%). *S. flexneri* was associated with resistance to ampicilin and to chloramphenicol, while *S. sonnei* was associated with resistance to azitromicin. Resistance to three or more antimicrobial was associated with *S. flexneri*. The presence of *pic*, *set* e *sepA* genes was associated with resistance to at least three antimicrobials. Strains harboring higher number of virulence genes were associated with resistance to more antimicrobials. In conclusion, shigellosis in children from Fortaleza has major and similar proportions of *S. sonnei* and *S. flexneri*. In addition, the former is associated with increased disease severity, lower socioeconomic level, higher number of virulence genes, the concomitant presence of *pic*, *set* e *sepA* genes and resistance to three or more antimicrobials. This study suggests a potential socioeconomic transition of the population and alerts for the resistance to commonly prescribed antimicrobials. Moreover, resistance to some antimicrobials can be *Shigella* serogroup-specific and is associated with higher bacterial virulence.

**Key-words:** Shigellosis, Diarrhea, Virulence. Resistance.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição dos sorogrupos <i>Shigella sonnei</i> e <i>Shigella flexneri</i> no mundo: razão de prevalência <i>S. sonnei/S. flexneri</i> .....	22
FIGURA 2	Fotografia de modelo celular de infecção por <i>Shigella</i> : linhagem de fibroblastos L2 de camundongos infectados por <i>S. flexneri</i> .....	25
FIGURA 3	Esquema do processo de invasão, propagação e inflamação gerada pela infecção por <i>Shigella</i> .....	26
FIGURA 4	Prevalência global da resistência de <i>Shigella</i> a antimicrobianos de 1940 a 2010.....	35
FIGURA 5	Fluxograma das etapas do presente estudo, desde a aplicação de questionários, até a coleta e processamento das fezes, sorotipagem, teste de sensibilidade a antimicrobianos e pesquisa de genes de virulência.....	40
FIGURA 6	Distribuição geográfica das crianças infectadas por cepas de <i>Shigella spp.</i> do estudo no mapa de Fortaleza.....	51
FIGURA 7	Distribuição geográfica das crianças infectadas por cepas de <i>S. sonnei</i> e <i>S. flexneri</i> do estudo em mapas de calor por densidade de Kernel.....	51
FIGURA 8	Fotodocumentação de gel de agarose com os produtos de PCR representativa do teste de validação dos iniciadores com seus respectivos controles positivos.....	53
FIGURA 9	Fotodocumentação de gel de agarose a 3% com os produtos das PCR múltiplas 1, 2, 3 e 4 .....	54
FIGURA 10	Fotodocumentação de gel de agarose a 3% com os produtos da PCR múltipla 1 em amostras do estudo.....	55
FIGURA 11	Árvore de decisão construída pelo programa CART (Árvore de Classificação e Regressão) combinando genes de virulência de <i>Shigella</i> sp. e presença de sangue nas fezes das crianças analisadas.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Distribuição dos sorogrupos de <i>Shigella</i> spp no estudo.....	49
GRÁFICO 2	Distribuição dos sorogrupos de <i>Shigella</i> spp. quanto à renda mensal familiar das crianças do estudo.....	50
GRÁFICO 3	Avaliação da infecção por <i>Shigella</i> sp. e sorogrupos quanto à distribuição pluviométrica em Fortaleza no período do estudo. A) Número de casos totais de <i>Shigella</i> sp. e de cada sorogrupo ( <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> e <i>S. boydii</i> ) durante o período de estudo e B) Distribuição pluviométrica da cidade de Fortaleza durante o período de estudo.....	52
GRÁFICO 4	Distribuição dos genes <i>pic</i> , <i>set</i> e <i>sepA</i> entre isolados de <i>Shigella sonnei</i> e <i>Shigella flexneri</i> .....	58
GRÁFICO 5	Comparação da resistência aos antimicrobianos entre os sorogrupos mais prevalentes de <i>Shigella</i> spp.....	60
GRÁFICO 6	Relação da resistência a mais de dois antimicrobianos e a quantidade de genes de virulência de cada isolado de <i>Shigella</i> spp.....	63
GRÁFICO 7	Distribuição da resistência a antimicrobianos específicos entre os isolados de <i>Shigella</i> spp. com prevalência acima ou abaixo de 80% dos genes de virulência analisados.....	64
GRÁFICO 8	Frequência das manifestações clínicas (presença de sangue nas fezes, dor abdominal intensa, vômito e febre) em crianças infectadas pelos sorogrupos <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella sonnei</i> .	66
GRÁFICO 9	Frequência das manifestações clínicas (presença de sangue nas fezes, dor abdominal intensa, vômito e febre) em crianças infectadas por espécies de <i>Shigella</i> spp. que continham ou não o gene <i>sepA</i> .....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Genes de virulência e seus respectivos produtos proteicos analisados no estudo.....	43
TABELA 2	Relação das cepas bacterianas utilizadas como controle positivo para as reações de PCR e seus respectivos genes.....	43
TABELA 3	Genes alvo, sequência dos iniciadores, tamanhos dos produtos obtidos, temperaturas de anelamento das reações múltiplas para investigação dos genes de virulência de <i>Shigella</i> spp.....	44
TABELA 4	Pontos de corte dos diâmetros do halo de inibição para interpretação e classificação em sensível, intermediário e resistente.....	46
TABELA 5	Caracterização quanto ao gênero e idade das crianças com diarreia diagnosticadas com <i>Shigella</i> spp.....	48
TABELA 6	Caracterização quanto ao sexo e renda mensal familiar das crianças com diarreia infectadas por <i>Shigella</i> spp.....	49
TABELA 7	Deteção dos genes de virulência em <i>Shigella</i> spp. isoladas de fezes de crianças em Fortaleza, Ceará, Brasil.....	56
TABELA 8	Caracterização quanto à quantidade de isolados de <i>Shigella</i> spp. e o número de genes de virulência detectados.....	57
TABELA 9	Antimicrobianos analisados e as taxas de isolados de <i>Shigella</i> spp. resistentes.....	59
TABELA 10	Caracterização quanto ao número de antimicrobianos aos quais os sorogrupos de <i>Shigella</i> spp são resistentes.....	61
TABELA 11	Distribuição da resistência a três ou mais antimicrobianos e a presença dos genes <i>pic</i> , <i>set</i> e <i>sepA</i> entre os isolados de <i>Shigella</i> spp.....	62
TABELA 12	Caracterização quanto aos sintomas clínicos das crianças com diarreia diagnosticadas com <i>Shigella</i> spp.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
AZT	Azitromicina
CAC	Centro de Assistência à Criança
CART	Classification and Regression Tree – Árvore de Classificação e Regressão
CEF	Cefalotina
CRO	Ceftriaxona
CXM	Cefuroxime
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CN	Gentamicina
CDC	Center for Disease Control and Prevention - Centro para Prevenção e Controle de Doenças
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute – Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
ESPGHAN	Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição
ETEC	Escherichia coli enterotoxigênica
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
GEMS	The Global Enterics MultiCenter Study – Estudo Multicêntrico Entérico Global
HE	Ágar Entérico de Hektoen
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
ipaA	Antígeno plasmidial de invasão A
ipaB	Antígeno plasmidial de invasão B
ipaC	Antígeno plasmidial de invasão C
ipaD	Antígeno plasmidial de invasão D
icsB	Prevenção do reconhecimento autofágico
icsA	Proteína controladora da mobilidade via actina
LDI-UFC	Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Ceará
MAC	Ágar MacConkey
MAL-ED	The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development – Interações de Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde Infantil e Desenvolvimento
MS	Ministério da Saúde
NA	Ácido nalidíxico
OMS	Organização Mundial de Saúde
pic	Protease Pic – atividade de mucinase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
sepA	Protease / indutor inflamatório
sigA	Protease SigA – atividade de hemaglutinação

set	Enterotoxina 1 de Shigella (Shet1)
sen	Enterotoxina 2 de Shigella (Shet2)
stx	Toxina Shiga
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprima
Ta	Temperatura de anelamento
TET	Tetraciclina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSB	Caldo triptona de soja
UV	Luz ultravioleta
virB	Regulador do ial
virF	Regulador do virB

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Diarreias infecciosas.....	17
2.2	<i>Shigella</i> spp.....	19
2.3	Epidemiologia da shigelose.....	20
2.4	Patogênese e fatores de virulência da shigelose.....	24
2.5	Manifestações clínicas da shigelose.....	28
2.6	Diagnóstico laboratorial da shigelose.....	29
2.7	Investigação filogenética em shigelose.....	31
2.8	Tratamento, controle e prevenção da shigelose.....	32
2.9	Resistência antimicrobiana em shigelose.....	33
3	HIPÓTESES.....	37
4	OBJETIVO GERAL.....	38
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
7	RESULTADOS.....	48
7.1	Caracterização demográfica da população.....	48
7.2	Distribuição dos sorogrupos de <i>Shigella</i> spp.....	48
7.3	Análise da renda mensal e sorogrupos de <i>Shigella</i> spp.....	49
7.4	Distribuição geográfica das crianças e sorogrupos de <i>Shigella</i> spp.....	50
7.5	Avaliação da sazonalidade dos isolados de <i>Shigella</i> spp.....	52
7.6	Desenvolvimento de reações de PCR multiplex para detecção de genes de virulência.....	53
7.7	Distribuição dos genes de virulência entre os isolados de <i>Shigella</i> spp.....	55
7.8	Avaliação da resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Shigella</i> spp.....	58
7.9	Análise de associação entre virulência e resistência antimicrobiana em <i>Shigella</i> spp.....	61
7.10	Avaliação clínica e determinantes microbianos de <i>Shigella</i> .....	64
8	DISCUSSÃO.....	69
9	CONCLUSÕES.....	83
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
11	ANEXOS.....	97

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas representam um relevante problema de saúde pública mundial, sendo a segunda causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Apesar da significativa redução das taxas de mortalidade nas últimas décadas, as altas taxas de morbidade ainda preocupam a sociedade, com uma estimativa de 1.731 bilhões de episódios em 2010, principalmente em países em desenvolvimento (WALKER et al., 2013). Ademais, estudos nos últimos anos têm mostrado consequências negativas dos episódios diarreicos na infância para os desenvolvimentos físico e cognitivo (LORNTZ et al., 2006; RICHARD et al., 2013).

Neste contexto, diversos agentes etiológicos estão envolvidos e as bactérias do gênero *Shigella* são relatadas com grande destaque. Recentemente, dois grandes estudos epidemiológicos multicêntricos reforçaram a importância da shigelose em crianças de países em desenvolvimento, elencando o patógeno como um dos mais prevalentes, além de mostrarem associação com disenteria (KOTLOFF et al., 2013; PLATTSMILL et al., 2015). Entretanto, o combate a este patógeno permanece pouco efetivo. É imperativa a realização de estudos em diferentes populações para uma melhor compreensão da virulência e da resistência antimicrobiana da shigelose, contribuindo para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas que reflitam as condições genéticas e ambientais de cada local.

No Brasil, estudos sobre a epidemiologia molecular da shigelose que abordem fatores de risco, distribuição das espécies, resistência antimicrobiana e associação entre fatores genéticos da bactéria e as manifestações clínicas da doença são escassos. Além disso, devido à grande extensão territorial do país e heterogeneidade socioeconômica da população, há a impossibilidade da generalização de dados nacionais, tornando necessária a realização de estudos locais.

O presente estudo se apresenta como uma tentativa de elucidar tais lacunas. A investigação etiológica da diarreia moderada à grave em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil, apontou a *Shigella* spp como o patógeno mais prevalente (QUETZ et al., 2012). A partir da análise dos isolados de *Shigella* spp desta população, o presente estudo buscou caracterizar: os determinantes socioeconômicos e geográficos da shigelose; a distribuição das espécies; a severidade da diarreia, a prevalência e a associação de genes de virulência com as manifestações clínicas; a resistência antimicrobiana dos isolados; e a relação entre virulência e resistência em *Shigella*.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diarreias infecciosas

As diarreias infecciosas constituem um grande problema de saúde pública mundial, sendo especialmente relevante na população infantil. Doenças diarreicas representam a segunda maior causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). O último grande 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, onde mais de 70% dessas mortes foram relatadas em crianças abaixo de dois anos de idade (WALKER et al., 2013).

No final do século passado, os esforços da Organização Mundial de Saúde (OMS) e dos governos em implementar medidas para o controle das diarreias infecciosas em crianças, tais como vacina para rotavírus, investimento em saneamento básico e terapia do soro para reidratação oral, possibilitaram considerável queda das taxas de mortalidade, de 4,5 milhões de mortes/ano ao final dos anos 90 para 1,5 milhão de mortes/ano em 2010 (BLACK et al., 2010). Entretanto, o ainda elevado número de mortes por doenças diarreicas e, principalmente, a alta morbidade deste fenômeno devem ainda servir de preocupação para a sociedade (BARTELT et al., 2013). Neste contexto, percebe-se uma maior gravidade do problema na África subsaariana e Sudeste asiático (LIU et al., 2012).

No Brasil, a melhoria das condições socioeconômicas e sanitárias nos últimos anos também levaram a uma redução em 46,3% das taxas de mortalidade por diarreia na população infantil (ANDRADE et al., 2011; RASELLA et al., 2013). Os dados oficiais mais recentes do Ministério da Saúde (MS) mostram a ocorrência de 2.490 óbitos no ano de 2005, sendo 8 dos 10 estados federativos com maior frequência pertencentes às regiões Norte e Nordeste (Pernambuco, Bahia, Maranhão, Ceará, Alagoas, Sergipe, Pará e Amazonas). Da mesma forma, 75% dos casos fatais ocorreram nessas regiões (BRASIL, 2005).

A diarreia é uma síndrome intestinal determinada pelo aumento de volume, quantidade de água ou frequência das evacuações. As diarreias infecciosas são caracterizadas pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de patógenos, e são comumente acompanhadas de náusea, vômito e dores abdominais. A transmissão ocorre usualmente por água ou alimentos contaminados, de pessoa a pessoa ou resultado de higiene e saneamento básico precários.

(PETRI et al., 2008). Diversos organismos patogênicos podem estar associados, sejam bactérias, vírus ou protozoários (LANATA et al., 2013).

Recentemente, dois grandes estudos epidemiológicos multicêntricos, financiados pela Fundação Bill and Melinda Gates, investigaram o impacto mundial da diarreia infantil (SCHARF et al., 2014). O estudo intitulado Estudo Multicêntrico Entérico Global (*The Global Enterics MultiCenter Study - GEMS*), é a maior análise já realizada para o estudo da diarreia infantil moderada a grave no mundo, englobando mais de 22 mil crianças com até cinco anos de vida de sete países da África e Ásia (Mali, Gâmbia, Kênia, Moçambique, Bangladesh, Índia e Paquistão) em um desenho de caso-controle. Este estudo elencou quatro patógenos como os mais importantes causadores de diarreia moderada a grave: Rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (KOTLOFF et al., 2013).

O outro estudo, 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 (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia) para investigação da diarreia da comunidade, que não necessita de um atendimento médico de emergência. Este coorte listou os patógenos Rotavírus, Norovírus, *Campylobacter* spp, astrovírus, *Shigella* spp e *Cryptosporidium*, como os principais causadores da diarreia da comunidade (PLATTSMILLS et al., 2015).

Um fator de risco importante para a ocorrência de diarreias infecciosas é a desnutrição. O comprometimento da resposta imune inata pode levar a uma maior suscetibilidade ao estabelecimento de infecções entéricas que, por sua vez, desencadeiam um estado de má-absorção de nutrientes, além de dano tecidual e inflamação intestinal. Neste contexto, ocorre o que autores referem como o ciclo vicioso infecções entéricas-desnutrição. 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).

Diversos estudos têm associado eventos diarreicos a prejuízos no desenvolvimento físico-infantil (KEUSCH et al., 2013; KOSEK et al., 2013; RICHARD et al., 2013). Richard e colaboradores mostraram, por meio da análise conjunta de dados de sete diferentes coortes de Bangladesh, Brasil, Guiné-Bissau e Peru, que a ocorrência de diarreia foi consistentemente associada à redução de peso nas crianças a curto prazo e à redução na altura das crianças a longo prazo. O desenvolvimento cognitivo prejudicado já foi também demonstrado estar associado a

eventos diarreicos na infância precoce por vários estudos (FISHER et al., 2012; LORNTZ et al., 2006; PATRICK et al., 2005; NIEHAUS et al., 2002).

Estudos recentes sugerem também que crianças com crescimento prejudicado e repetidas infecções entéricas são mais propícias a desenvolver obesidade e morbidades cardiovasculares (DEBOER et al., 2013; GUERRANT et al., 2013). Dessa forma, a ruptura na barreira intestinal parece estar envolvida à modificação da microbiota, com inflamação crônica sistêmica, parece estar envolvida (ORIA et al., 2016).

O impacto econômico das doenças diarreicas para a sociedade também não deve ser negligenciado. Além de gerarem uma elevada demanda sobre os serviços ambulatoriais e, secundariamente, sobrecarregarem a rede hospitalar (VASCONCELOS et al., 2008), a diarreia infantil leva, a longo prazo e por meio de alterações no desenvolvimento físico e cognitivo, ao prejuízo da capacidade produtiva humana (ADAIR et al., 2013).

## 2.2 *Shigella* spp.

A primeira descrição sobre *Shigella* aconteceu no ano de 1898 pelo médico japonês Kyoshi Shiga, após a investigação de um grande surto de disenteria no Japão. A epidemia de 1897 afetou mais de 90 mil indivíduos, com uma taxa de mortalidade acima de 20%. Shiga havia sido inspirado pelo renomado doutor Shibasaburo Kitasato, que estudou com Robert Koch, e ingressou no Instituto de Doenças Infecciosas de Tóquio para estudar doenças infecciosas sob os postulados de Koch. Após o isolamento do micro-organismo das fezes e a demonstração de que esta bactéria causava diarreia em cachorros saudáveis, Shiga demonstrou a capacidade de esse micro-organismo aglutinar com o soro de pacientes convalescentes, gerando a publicação de seus achados. Inicialmente, o micro-organismo foi denominado *Bacillus dysenterie*. Shiga descreveu também a produção de fatores tóxicos, dentre eles a atualmente conhecida toxina de Shiga. Após a identificação de *Shigella dysenteriae*, outros pesquisadores identificaram organismos semelhantes, como Flexner em 1900 e Sonne em 1915. O gênero *Shigella* foi assim denominado somente em 1930 (TROFA et al., 1999).

O gênero *Shigella* compreende um grupo de bactérias Gram-negativas pertencentes à tribo *Escherichieae* da família *Enterobacteriaceae*. São descritas como pequenos bacilos Gram-negativo, imóveis, sem cápsula, não-fermentadores de lactose e anaeróbios facultativos (NIYOGI, 2005).

As diferentes espécies de *Shigella*, também denominadas sorogrupos, são classificadas em: *S. dysenteriae* (sorogrupo A, constituído por 15 sorotipos); *S. flexneri* (sorogrupo B, composto por 6 subtipos); *S. boydii* (sorogrupo C, formado por 29 sorotipos); e *S. sonnei* (sorogrupo D, consistindo em uma variante). Esta classificação é baseada na composição do antígeno O do lipopolissacarídeo da membrana externa da parede celular. Sorogrupos A, B e C são mais semelhantes entre si bioquimicamente, enquanto a *S. sonnei* pode ser diferenciada pelas reações positivas de beta-D-galactosidase e ornitina-descarboxilase (LIMA et al., 2015).

Outras características bioquímicas gerais das bactérias deste gênero são: incapacidade de utilizar ácido cítrico como a única fonte de carboidratos, serem oxidase-negativas, não produzir ácido sulfídrico, não produzir gás a partir de glicose, serem inibidas por cianeto de potássio e não sintetizarem lisina descarboxilase, a qual está relacionada à produção de cadaverina, que inibe fatores de virulência de *Shigella* (MAURELLI, 2013).

### 2.3 Epidemiologia da shigelose

A incidência anual de diarreia devido a *Shigella* spp. no mundo é estimada em 165 milhões de casos, sendo mais de 100 milhões em países em desenvolvimento. Além disso, cerca de 1,1 milhão de mortes anuais ocorrem devido a shigelose (KOTLOFF et al., 1999). Estima-se ainda que 5 a 15% dos episódios de diarreia e 30 a 50% dos episódios de disenteria no mundo podem ser atribuídos à infecção por *Shigella* (NYOGI et al., 2005). Em estudo multicêntrico realizado em seis países asiáticos, a taxa de incidência de shigelose foi de 13% (SEIDLEN et al., 2006). Apesar da taxa de mortalidade por shigelose em países em desenvolvimento ter significativamente decrescido na última década, não houve grande alteração na taxa de morbidade (BARDHAN et al., 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 15 mil casos de shigelose confirmados em laboratório são reportados anualmente ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) (SCALAN et al., 2011). Entretanto, considerando as subnotificações, estima-se que este número pode estar dez vezes menor do que o valor real (JOH et al., 2013). A não realização de técnicas moleculares para o diagnóstico laboratorial contribui para a subnotificação (SEIDLEIN et al., 2006).

Embora os casos mais graves estejam relacionados a epidemias de *S. dysenteriae*, a maior prevalência se deve à shigelose endêmica, manifestada principalmente em crianças oriundas de países em desenvolvimento. A associação entre *Shigella* e diarreia varia com a

localidade e a idade das crianças, como demonstrado em um estudo multicêntrico, onde observou-se uma maior associação entre a quantidade de *Shigella* spp nas fezes e diarreia com o aumento da idade (LINDSAY et al., 2015). Em geral, a incidência maior ocorre em crianças de um a quatro anos de idade. Além disso, durante epidemias de *S. dysenteriae* sorotipo 1, todas as faixas etárias são afetadas. Em crianças desnutridas, *Shigella* causa o ciclo vicioso de desnutrição, infecção recorrente e conseqüente crescimento retardado (NYOGI et al., 2005).

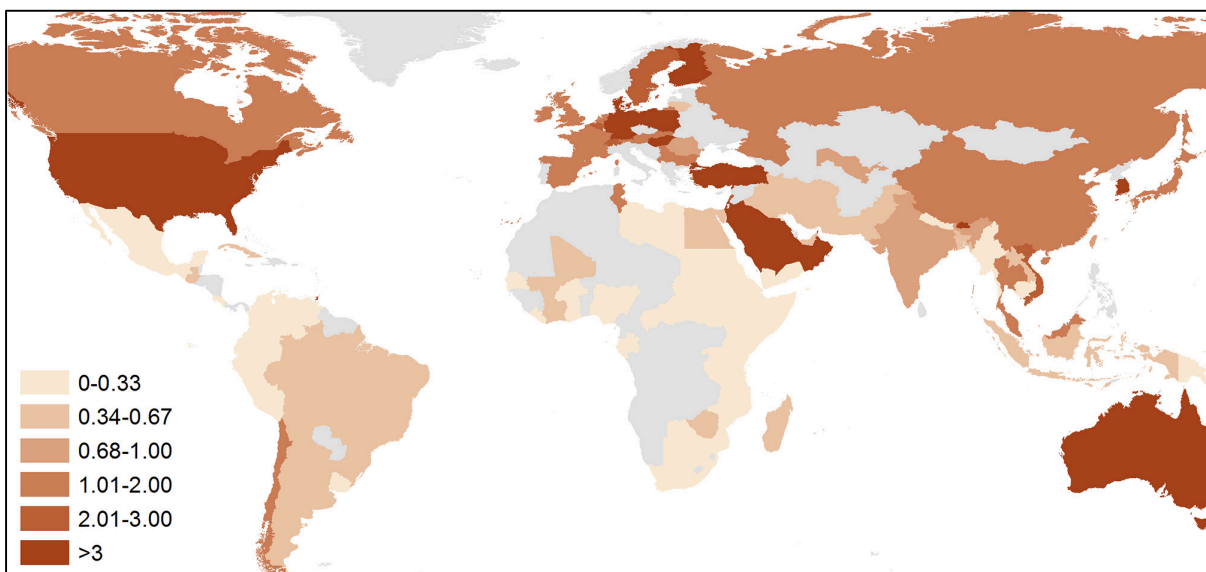
Dois recentes estudos epidemiológicos multicêntricos reforçaram a importância da *Shigella* spp. em crianças de países em desenvolvimento como causadora de diarreia, elencando o patógeno como um dos mais prevalentes, além de mostrar associação com disenteria (KOTLOFF et al., 2013; PLATTSMILLS et al., 2015).

Outros estudos também têm demonstrado a importância da *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 (FERDOU et al., 2014). Em países desenvolvidos, diversos surtos diarreicos têm suas causas reportadas como espécies de *Shigella* spp (GUZMAN et al., 2013; KOZAK et al., 2013).

Shigelose também é relatada em casos de “diarreia do viajante”, geralmente ocorrendo em indivíduos de países desenvolvidos que adquirem a infecção em viagens a países endêmicos. Em casos de diarreia adquirida em viagens de indivíduos de Quebec, Canadá, a regiões da América Central, Caribe e México, observou-se um grande prevalência de *Shigella* spp (TREPANIER et al., 2014). Outro estudo realizado com pacientes adultos com diarreia devido à *Shigella* spp. na Espanha identificou uma grande proporção de pacientes que havia regressado de viagens internacionais recentes (TORO et al., 2015).

A *S. flexneri* é classicamente mais relacionada a infecções de países em desenvolvimento, enquanto a *S. sonnei* é mais encontrada em países desenvolvidos, embora estudos epidemiológicos recentes apontem uma tendência para um aumento da prevalência global de *S. sonnei* (ANDERSON et al., 2016). Essa diferença pode ser caracterizada pela razão *S. sonnei/S. flexneri* global apresentada na FIGURA 1, onde os países mais ricos possuem razão acima de 2.01 (THOMPSON et al., 2015).

**FIGURA 1: Distribuição dos sorogrupos *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* no mundo: razão de prevalência *S. sonnei*/*S. flexneri*.**



Fonte: THOMPSON et al., 2015

No Brasil, devido à larga extensão territorial e contrastes socioeconômicos evidentes, há uma grande variação na distribuição dos sorogrupos. Enquanto em Minas Gerais e em São Paulo, há alta prevalência de *S. sonnei* (PENNATI et al., 2007; SOUSA et al., 2013), no Amazonas, Piauí e Rondônia, há predomínio de *S. flexneri* (DA CRUZ et al., 2014; NUNES et al., 2012; SILVA et al., 2008).

Em recente revisão, Thompson e colaboradores (2015) revisaram as duas hipóteses acerca das diferenças de distribuição entre *S. sonnei* e *S. flexneri*. Primeiramente, a alta prevalência de *Plesiomonas shigelloides* (um bacilo Gram-negativo) em áreas com elevada contaminação ambiental promove aos indivíduos, após frequente exposição a este micro-organismo, o desenvolvimento de resposta imune protetora contra *S. sonnei*, devido a *P. shigelloides* compartilhar similaridades estruturais na cadeia O do lipopolissacarídeo, importante antígeno de superfície para a produção de resposta imune adaptativa. Dessa forma, em áreas com contaminação ambiental, a proteção contra *S. sonnei* favorece a diminuição do número de infecções por este sorogrupo. Outra hipótese se refere à capacidade fagocítica da ameba *Acanthamoeba castellanii*, frequente em ambientes aquáticos, frente a bactérias do gênero *Shigella*, contribuindo para a proteção da bactéria contra tratamentos químicos da água. Contudo, a capacidade inibitória de *S. flexneri* impede a *A. castellanii* de atuar como

reservatório para este sorogrupo, levando o protozoário à morte celular por apoptose. Assim, este protozoário serve como reservatório de *S. sonnei* (THOMPSON et al., 2015).

As espécies menos prevalentes da grande maioria dos países, *Shigella boydii* e *Shigella dysenteriae*, são encontradas em frequências similares de 6 % dos casos (LIMA et al., 2015). Contudo, a distribuição de *S. boydii* concentra-se em maior parte em Bangladesh e Sudeste Asiático, enquanto *S. dysenteriae* é mais encontrada em casos de surtos graves, sendo o sorotipo 1 a causa da forma mais grave da doença e alvo de grande preocupação mundial (ANDERSON et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Este último sorogrupo, embora muito prevalente no século 19 e começo de século 20, tornou-se raro por razões não conhecidas (ANDERSON et al., 2016).

O processo de transmissão ocorre geralmente por água e alimento contaminados, além de contato direto pessoa-pessoa, embora outras vias de transmissão não sejam descartadas na shigelose (NYOGI et al., 2005). A transmissão sexual tem sido cada vez mais reportada (SIMMS et al., 2015), sendo sugerido o diagnóstico de infecção por HIV (Human Immunodeficiency Virus) em homens adultos com shigelose (TORO et al., 2015).

Diversos são os esforços para a caracterização de fatores de risco associados à shigelose em diferentes regiões do mundo. Em estudo que investigou a localização geográfica e os fatores de risco para diferentes sorogrupos de *Shigella* spp. em Matlab, Bangladesh, *S. flexneri* foi associada a casos endêmicos, enquanto *S. dysenteriae* foi associada a casos epidêmicos. Os autores concluíram que a infecção por *S. flexneri* é mais associada à contaminação ambiental, enquanto a infecção por *S. dysenteriae* é mais associada à higiene precária (EMCH et al., 2008).

Em outro estudo que investigou a distribuição espacial da shigelose, localidades próximas a hospitais, rios e com maior proporção de rituais religiosos (onde existe maior probabilidade de transmissão e contaminação inter-pessoas) foram associadas a maior risco de shigelose em Trang, Vietnã, indicando também que *S. flexneri* e *S. sonnei* possuíam distribuição espacial similar, apesar de o modo de transmissão não parecer o mesmo (KIM et al., 2008). Em estudo realizado na província de Jiangsu, análises de padrão espacial e temporal permitiram a identificação de fatores de transmissão de *Shigella* spp. na região, como a presença de rodovias, ferrovias, rios e lagos (TANG et al., 2014). Farag e colaboradores descreveram que o aumento da densidade populacional de moscas foi seguido por picos de infecção por *Shigella* spp em Mirzapur, Bangladesh, sugerindo um potencial modo de transmissão (FARAG et al., 2013).

## 2.4 Patogênese e fatores de virulência de *Shigella*

O gênero *Shigella* é bastante virulento, necessitando de pouco menos de 100 microorganismos para causar a doença (MAURICELLI et al., 2013). Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* investigaram os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese deste grupo de bactérias (JENNINSON et al., 2003). Neste contexto, o sorogrupo *S. flexneri* (mais especificamente os sorotipos 2a e 5a) é predominantemente utilizado como modelo para o conhecimento da patogênese deste gênero. Recentemente, Anderson e colaboradores reportam a ausência de conhecimentos mais amplos sobre as outras espécies de *Shigella*, como possíveis relações entre diferentes eventos de transmissão e os sorogrupos (ANDERSON et al., 2016).

A capacidade da bactéria de resistir à acidez do estômago humano e ultrapassar as barreiras físicas do trato gastrointestinal é essencial para o estabelecimento da infecção. Ao alcançar o cólon, o bacilo invade a mucosa epitelial e inicia ciclos de replicação, que resultam em intensa resposta inflamatória. Este processo gera as manifestações clínicas da doença (JENNINSON et al., 2003). A base molecular da não ocorrência de invasão ao intestino delgado ainda não foi desvendada (ANDERSON et al., 2016).

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

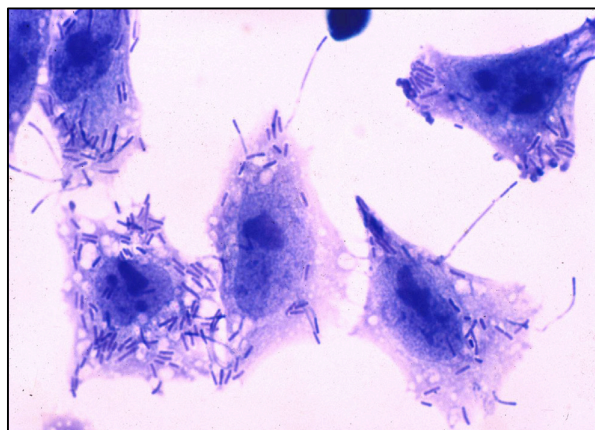
A camada de muco do intestino também interfere no sucesso da colonização de *Shigella* spp.. É sugerido que a bactéria reorganize as moléculas de mucina, promovendo acúmulo na superfície de células infectadas, assim facilitando o acesso ao epitélio. *S. flexneri* altera a transcrição gênica de várias mucinas em um processo dependente da proteína MxiD, componente do sistema de secreção da bactéria (ANDERSON et al., 2016).

O processo de adesão em *Shigella* ainda é pouco investigado, apesar de ser uma etapa essencial para o desenvolvimento da patogênese de patógenos intracelulares. Outras proteínas devem ser correlacionadas com função de adesão em estudos futuros (LIMA et al., 2015).



A invasão e colonização do epitélio intestinal são fatores determinantes para a patogênese da shigelose e, para isso, são necessárias ações de múltiplos genes. A FIGURA 2 mostra a invasão de *Shigella* em fibroblastos de camundongos (MAURICELLI et al., 2013).

**FIGURA 2: Fotografia de modelo celular de infecção por *Shigella*: linhagem de fibroblastos L2 de camundongos infectados por *S. flexneri*.**

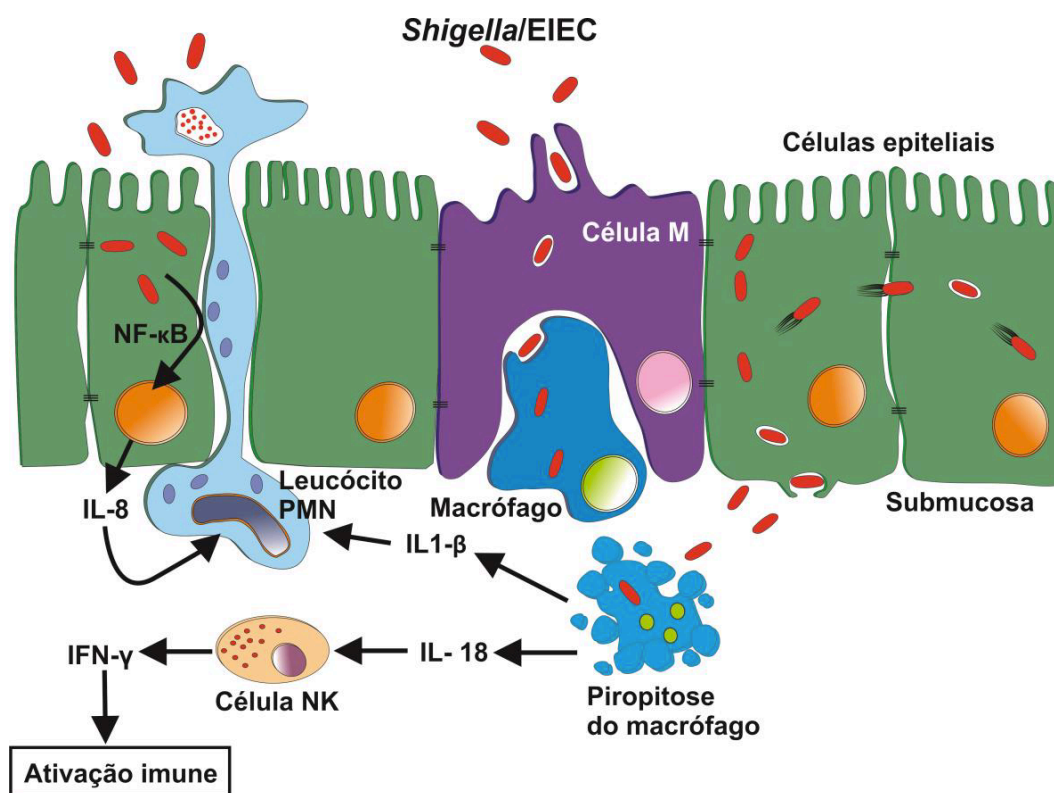


Fonte: MAURELLI et. al., 2013

O processo de patogênese pode ser dividido em quatro estágios: (1) invasão celular; (2) multiplicação intracelular; (3) propagação inter e intracelular; e (4) morte da célula hospedeira (FIGURA 3) (MAURICELLI et al., 2013; NYOGI et al., 2005). A bactéria invade o epitélio intestinal, usando como “rota” as células M (células epiteliais membranosas que transportam antígenos do lúmen pela barreira intestinal para ação de linfócitos e macrófagos). Em seguida, alcançam a lâmina própria, infectando macrófagos e reinvadindo o epitélio pela membrana basolateral. Os macrófagos são induzidos à apoptose, liberando grandes quantidades de IL-1, importante mediador inflamatório responsável pelo recrutamento de células polimorfonucleares para o sítio de infecção. Neste contexto, *Shigella* interage com as células da lâmina própria em diferentes formas (SALGADO-PABÓN et al., 2014).

O influxo de *Shigella* pela camada epitelial danifica a integridade do epitélio, permitindo a entrada de bactérias do lúmen por meio de mecanismos independentes das células M (JENNISON et al., 2003).

**FIGURA 3: Esquema do processo de patobiologia (invasão, propagação e inflamação gerada) pela infecção por *Shigella*.**



Fonte: Dissertação de mestrado de Mariana Duarte Bona, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará. A **Figura 3** esquematiza os eventos da patobiologia em shigelose. A bactéria invade o epitélio intestinal através das células M, por meio de um processo de endocitose. Os macrófagos da lâmina própria a reconhecem e são induzidos à morte por piroptose. Dessa forma, a bactéria fica livre para reinvidir o epitélio pela via basolateral, sendo capaz de se multiplicar e se locomover entre diferentes células do epitélio. De forma concomitante, diversos mediadores inflamatórios, como IL-8, IL-18, IL-1 $\beta$ , são liberados e medeiam o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN), além de induzir a ativação de células NK e IFN- $\gamma$ . A lesão da barreira epitelial intestinal permite ainda que outras bactérias do lúmen invadam a lâmina própria por vias independentes da célula M.

Estudos de invasão celular de *Shigella* spp apontam que este processo é mediado pelo plasmídeo de virulência. Nele, o locus *ipa* seria responsável pela produção dos antígenos plasmidiais de invasão (IpaA, B, C e D), além de outros fatores importantes para a invasão, como a proteína SepA. Yang e colaboradores descreveram recentemente o papel do IpaB no processo de escape das células imune (YANG et al., 2015).

O locus *mxi-spa* é responsável pela produção dos componentes do sistema de secreção do tipo III, que tem a função de liberar diversas proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para a célula hospedeira. Recentemente, o gene *virK* foi relatado como um dos reguladores deste processo de liberação (SIDKI et al., 2014). Tais efetores têm a função de invasão celular, sobrevivência intracelular e evasão de resposta imune, a partir de atuação em diferentes processos celulares (ASHIDA et al., 2015). Neste contexto, um emergente alvo das funções efetoras em *Shigella* é o sistema de ubiquitina do hospedeiro, envolvido em variados processos celulares (TANNER et al., 2015). Estudo mais recente buscou caracterizar a máquina do sistema de secreção tipo III de *Shigella* a partir de tomografia eletrônica (HU et al., 2015).

A família de proteínas IpaH compreende um grupo de efetores caracterizado por atuarem na sobrevivência bacteriana, ativando morte celular de macrófagos e inibindo NFκB (ASHIDA et al., 2016). Após a entrada, a *Shigella* é capaz de se mover dentro do citoplasma e entrar em células epiteliais adjacentes. Para esta propagação intra e intercelular, a proteína IcsA é crucial, interagindo com fatores do hospedeiro e usando a polimerização de actina para a motilidade. Mais recentemente, IcsA tem sido implicada no processo de adesão, propiciando o contato com a célula do hospedeiro, sendo dependente da ativação do SST3 por sais biliares (ZUMSTEG et al., 2014). Neste processo, a proteína IcsB é importante para evitar reconhecimento autofágico do hospedeiro (SCHROEDER et al., 2008).

Outro gene relacionado à invasão bacteriana e sobrevivência intracelular é o *ial*, que por sua vez é regulado pelo gene *virB*. A regulação da expressão do *virB* acontece pela expressão do gene *virF*. Vários outros genes produtores de fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da shigelose, como *pic* e *sigA*, localizados no cromossomo e responsáveis pela expressão das proteases Pic e SigA, respectivamente, as quais agem pela atividade de mucinase e hemaglutinação (JENNINSON et al., 2003; SCHROEDER et al., 2008; FAHERTY et al., 2012). Zhang e colaboradores demonstraram que a deleção do gene *pic* em cepa de *S. flexneri* isolada na China diminuiu a virulência a partir de análises *in vitro* de invasão celular e *in vivo* de dano tecidual em camundongos (ZHANG et al., 2013).

O severo dano tecidual causado por *Shigella* resulta em absorção deficiente de água, nutrientes e solutos, que pode causar diarreia, bem como a presença de sangue e muco nas fezes. Neste contexto, algumas toxinas são descritas como atuantes no processo. A enterotoxina 1 de *Shigella*, ou ShET1, (codificada pelo gene *set*) e a enterotoxina 2 de *Shigella*, ou ShET2 (codificada pelo gene *sen*), induzem secreção de fluidos para o intestino, contribuindo para a diarreia aquosa (FARFAN et al., 2011). ShET1 e ShET2 são reconhecidamente importantes

fatores de virulência em *Shigella*, sendo avaliadas como potenciais alvos para vacinas (KOTLOFF et al., 2004). Além delas, a toxina Shiga (codificado pelo gene *stx*), presente na *Shigella dysenteriae* tipo 1, é citotóxica para variados tipos celulares e responsável pelo desenvolvimento de lesões vasculares no cólon, rim e sistema nervoso central (NYOGI et al., 2005; SCHROEDER et al., 2008).

Apesar dos avanços no entendimento da patogênese da shigelose até os dias de hoje, Anderson e colaboradores apontam para a necessidade de uma maior realização de pesquisa básica para o avanço na compreensão da colonização por *Shigella* (ANDERSON et al., 2016).

## 2.5 Manifestações clínicas da shigelose

A clínica da shigelose pode ser caracterizada por manifestações intestinais e extra-intestinais. O período de incubação é de 1 a 7 dias, mas os sintomas geralmente ocorrem dentro de 3 dias. Apesar da severidade, a infecção é auto-limitada e, se não tratada, tem geralmente duração de uma a duas semanas, embora possa durar até um mês (MAURICELLI et al., 2013).

O espectro pode variar de uma diarreia leve aquosa até disenteria grave. O estágio de disenteria pode ou não ser precedido da diarreia aquosa, que é provavelmente associada à passagem da bactéria pelo intestino delgado e indução de secreção intestinal (MAURICELLI et al., 2013). Outros sintomas não específicos podem acompanhar a infecção, como febre e dores abdominais. Cerca de um terço dos pacientes apresentam febre (DUPONT et al., 2005).

*S. dysenteriae* sorotipo 1 causa a forma mais grave da doença, enquanto *S. sonnei* é caracterizada pela forma mais leve. *S. flexneri* e *S. boydii* possuem espectros mais variados da doença (MAURICELLI et al., 2013).

*Shigella* spp é a principal causa de disenteria no mundo, porém outras espécies também podem causar disenteria (FERDOU et al., 2014). Em um estudo de caso-controle com crianças de comunidades do Paquistão, buscou-se comparar a diarreia causada por *Shigella* spp. com espécies de *Campylobacter* spp., outra bactéria reconhecida pela associação com disenteria. A shigelose apresentou indivíduos mais frequentemente acometidos com dores abdominais e disenteria (SOOFI et al., 2011).

A presença de *Shigella* spp. já foi relatada em indivíduos assintomáticos, com maior prevalência em adultos, porém também em crianças de comunidade na Índia. É sugerido que portadores assintomáticos sejam determinantes no ciclo de transmissão da doença (GHOSH et al., 2014). Em estudo de coorte 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).

As manifestações extra-intestinais da shigelose foram demonstradas em estudo realizado em Bangladesh, identificando reação leucemóide, síndrome hemolítica urêmica, hiponatremia grave e distúrbios neurológicos. Neste estudo, *S. dysenteriae* tipo 1 foi o sorotipo mais prevalente associado a essas manifestações. (KHAN et al., 2013).

Estados de imunossupressão, como infecção pelo vírus do HIV e desnutrição, podem estar associados, em casos mais atípicos, a uma infecção sistêmica de *Shigella* (“Shigellemia”). 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).

## 2.6 Diagnóstico laboratorial de shigelose

O diagnóstico laboratorial da shigelose pode ser realizado por técnicas que envolvam identificação bioquímica, sorológica ou molecular. Atualmente, os métodos microbiológicos convencionais, com o isolamento do microrganismo, ainda são os mais utilizados na rotina. Utiliza-se meios de cultura seletivos, como Ágar Salmonela-Shigella (em que as espécies exibem inibição do crescimento variável e colônias incolores sem enegrecimento), Ágar Hektoen (onde formam colônias verde-escuras), Ágar MacConkey (onde formam colônias incolores), Ágar EMB (onde formam colônias transparentes) e Ágar XLD (onde formam colônias transparentes) (KONEMAN et al., 2008). A confirmação da identificação é obtida a partir de testes bioquímicos e sorológicos, compreendendo um processo que pode levar de 3 a 5 dias para a obtenção do resultado (LI et al., 2009). As provas bioquímicas referem-se às características como citocromo-oxidase negativas, fermentadoras de glicose com produção de ácido, geralmente sem gás, não fermentam lactose, não hidrolisam ureia, não produzem gás sulfídrico, não descarboxilam a lisina e, além disso, não utilizam citrato nem acetato de sódio como fonte de carbono.

Diante desta realidade, muitos estudos têm sugerido novas metodologias, com princípios moleculares, para a detecção de *Shigella* (MOKHTARI et al., 2012). É bem documentado que as espécies de *Shigella* são organismos frágeis que podem não ser identificados por metodologias microbiológicas de rotina. Um estudo multicêntrico realizado

na Ásia apontou que a incidência da shigelose deve exceder as estimativas prévias, já que o DNA de *Shigella* pôde ser detectado em até um terço das amostras com cultura negativa (SEIDLEN et al., 2006).

As técnicas moleculares de detecção de genes para diagnóstico utilizam em geral o gene *ipaH* como alvo. IpaH é uma proteína que compõe o complexo de invasão celular, sendo presente em múltiplas cópias (4 a 10) distribuídas no plasmídeo e no cromossomo (LI et al., 2009; MOKHTARI et al., 2012; OJHA et al., 2013; RANJBAR et al., 2014; THIEM et al., 2001; ZHAO et al., 2013).

As principais vantagens dos métodos moleculares para diagnóstico de *Shigella* são a rapidez dos resultados e os melhores valores de sensibilidade e especificidade, como demonstrados por alguns estudos que compararam a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em relação à cultura microbiológica convencional (LINDSAY et al., 2015; MOKHTARI et al., 2012; THIEM et al., 2001). Outras metodologias baseadas em quimioluminescência (LUMINEX), sondas acopladas a reações de PCR (Taqman) e espectrometria de massa (MALDI-TOF) também têm sido desenvolvidas (KHOT et al., 2013; LIU et al., 2013; LIU et al., 2014).

Um grande desafio para o diagnóstico de *Shigella* é a diferenciação das cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva. Técnicas de sorotipagem são frequentemente utilizadas, porém não têm eficiência completa (LIMA et al., 2015). Ambas as espécies possuem 80-90% de similaridade quanto ao genoma (ambas possuem o gene *ipaH*) e estudos sugerem que estas bactérias surgiram de um mesmo ancestral e que poderiam estar agrupadas como um subgrupo dentro do gênero *Escherichia* (LAN et al., 2004). Entretanto, por razões históricas e médicas, estes dois grupos de patógenos mantiveram-se como diferentes (STROCKBINE et al., 2005).

O uso dos testes bioquímicos permite a diferenciação de *Shigella* e *E. coli*, pois cepas de *E. coli* são geralmente móveis, positivas para descarboxilase, fermentam glicose com formação de gás e são indol-negativo, enquanto cepas de *Shigella* spp. se comportam de modo contrário (BELD et al., 2002). Em relação à diferenciação da *E. coli* enteroinvasiva, não há consenso estabelecido (LIMA et al., 2015).

As técnicas moleculares podem também ajudar no manejo da doença, apontando espécies mais susceptíveis a antimicrobianos, por meio da detecção de genes codificadores de proteínas envolvidas em mecanismos de resistência antimicrobiana, ou avaliando a severidade da infecção, por meio da quantificação microbiana de *Shigella* spp. (LINDSAY et al., 2013;

TARIQ et al., 2012). Além disso, há a capacidade da diferenciação das espécies, usualmente por PCR múltiplos ou microarranjo de DNA (LI et al., 2009; OJHA et al., 2013).

## 2.7 Investigação filogenética

Nos últimos anos, vários estudos têm buscado uma melhor caracterização genética de cepas de *Shigella* spp. por meio de abordagens filogenéticas, seja com o intuito de caracterizar as origens evolutivas, entender as variações de sorogrupos em diferentes populações, propor novas metodologias de diagnóstico ou de explicar o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (CAO et al., 2012; PUPO et al., 2000; SAHL et al., 2015).

O sequenciamento de múltiplos genes conservados mostrou que os clones de *Shigella* divergiram de vários ancestrais de *E. coli* em diferentes tempos entre 35 e 270 mil anos atrás (PUPO et al., 2000). Neste processo, *E. coli* enteroinvasiva teria surgido depois a partir de diferentes ancestrais (LAN et al., 2004). Sugere-se ainda que *S. sonnei* seja geneticamente mais similar à *E. coli* do que outras espécies. A retenção de genes de *E. coli* em *S. sonnei* pode permitir uma maior sobrevivência no ambiente ou no hospedeiro, enquanto *S. flexneri* perde genes com mais facilidade (THOMPSON et al., 2015).

Mais recentemente, outros estudos têm usado abordagens mais modernas para a caracterização genética de cepas de *Shigella* spp.. O uso de sequenciamento completo do genoma, *Whole-genome sequencing*, tem buscado uma caracterização mais fidedigna da genética de *Shigella* (CONNOR et al., 2015; HOLT et al., 2012; ROSSI et al., 2015; SAHL et al., 2015).

Utilizando esta abordagem, os autores caracterizaram a diversificação genética de *S. sonnei* a partir de um ancestral comum a cerca de 500 anos atrás, tendo ocorrido na Europa e se distribuído para diferentes localidades a partir de uma única linhagem (HOLT et al., 2012). Sahl e colaboradores mostraram o uso de análise genômica comparativa para o desenvolvimento de metodologia de detecção marcadores filogenéticos específicos para *Shigella* spp. com alta sensibilidade e especificidade (SAHL et al., 2015). Em outro estudo, Rossi e colaboradores mostraram a estabilidade do genoma de cepas de *Shigella* spp. após passagens seriadas e testes em laboratórios diferentes, a partir do sequenciamento do genoma completo (ROSSI et al., 2015).

## 2.8 Tratamento, controle e prevenção da shigelose

As abordagens de intervenção existentes para a redução de morbidade e mortalidade devido à diarreia são largamente conhecidas atualmente e bastante variadas, desde medidas que buscam prevenir ou tratar a doença, como uso de soro para reidratação oral, antibióticos, 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, o uso de antimicrobianos tem se justificado por: 1) diminuição da duração e severidade da doença; 2) bloqueio da transmissão; e 3) redução do risco de potenciais complicações (KLONTZ et al., 2015; SANGEETHA et al., 2014). A OMS recomenda o uso de ciprofloxacina como primeira linha de tratamento em adultos. O uso de outras fluoroquinolonas, da ceftriaxona (cinco dias de tratamento) ou da azitromicina (três dias de tratamento) é sugerido somente em casos de resistência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). A Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) preconiza a azitromicina como fármaco 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). Neste contexto, o MS recomenda a associação sulfametoxazol-trimetoprima 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).

Vários estudos têm avaliado o resultado de outras abordagens para o controle da shigelose. 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 China, 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 maior prevalência em crianças abaixo de cinco anos de idade em países em desenvolvimento. Apesar de mais de 60 anos de esforços, uma vacina segura e eficaz ainda não está disponível (KLONTZ et al., 2015). O uso mais recente de abordagens genômicas tem ajudado no desenvolvimento de vacinas (ROSSI et al., 2015). Vários estudos têm demonstrado a eficácia da imunização por diferentes antígenos em modelos animais. IpaB e IpaD, antígenos candidatos



por estarem presentes em todas as cepas de *Shigella* spp, já mostraram ser protetores a partir da indução de imunização humoral e celular, além de protegerem contra infecção letal pulmonar em camundongos (BECERRA et al., 2012).

Devido à resposta imune na shigelose ser sorogrupo-específica, a eficácia de uma vacina deve considerar a importância epidemiológica e distribuição dos sorogrupos de cada localidade, sendo este conhecimento de crucial importância para o desenvolvimento. (NYOGI et al., 2005). Para a prevenção universal da shigelose, portanto, uma vacina multivalente é necessária (SEIDLEN et al., 2006).

Nyogi e colaboradores afirmam a necessidade de se produzir uma vacina contra *S. dysenteriae* sorotipo 1 e *S. flexneri* sorotipo 2a (NYOGI et al., 2005). Entretanto, diante da constante melhoria na qualidade da água em todo o mundo e do acelerado desenvolvimento de resistência antimicrobiana, estima-se que o impacto de *S. sonnei* deve aumentar, sendo necessária a produção de vacina contra este sorogrupo (THOMPSON et al., 2015).

As tentativas de desenvolvimento de uma vacina para shigelose são variadas e iniciam-se com o teste de candidatos em modelos pré-clínicos. IpaB e IpaD, antígenos candidatos por estarem presentes em todas as cepas de *Shigella* spp, já mostraram ser indutores de imunização humoral e celular, além de protegerem contra infecção letal pulmonar em camundongos (MARTINEZ-BECERRA et al., 2012). De forma geral, diversas abordagens têm sido utilizadas, como vacinas de cepas atenuadas, vacinas de cepas inativadas por formalina, vacinas obtidas por processos de glicoconjugação e antígenos específicos (BARRY et al., 2013).

## **2.9 Resistência antimicrobiana da shigelose**

O problema da resistência antimicrobiana em shigelose tem sido reportado a alguns anos globalmente (ERDMAN et al., 2008; NYOGI et al., 2007), podendo variar entre etnia e idade do hospedeiro, bem como entre espécies circulantes no local (SHIFERAW et al., 2012). Desde a introdução das sulfonamidas no final da década de 1930, devido ao aparecimento de cepas resistentes, os clínicos tiveram uma grande sucessão de antimicrobianos disponíveis para tratamento de shigelose. Desta forma, sulfonamidas foram substituídas por tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol que, por sua vez, foram substituídos por ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, ácido nalidíxico e, em algumas regiões, pivmecillinam.

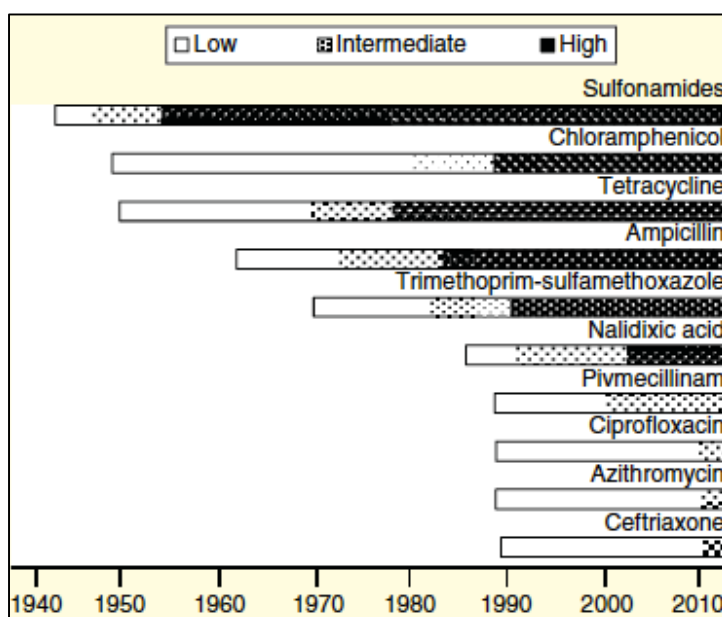
Atualmente, quinolonas, azitromicina e ceftriaxona são as principais escolhas para tratamento de shigelose, de acordo com revisão recente (KLONTZ et al., 2015).

Vários estudos têm relatado a emergência de cepas resistentes a estes antimicrobianos de amplo espectro (GOSH et al., 2011; TARIQ et al., 2012; GOSH et al., 2014; PONS et al., 2013; QU et al., 2014). O estudo de Toro e colaboradores mostrou que a resistência antimicrobiana a ciprofloxacina foi introduzida na Espanha a partir de pacientes que adquiriram cepas de *Shigella* spp. resistentes em viagens a outros países (TORO et al., 2015). Estudo de vigilância de doenças transmitidas por alimentos nos EUA no período de 2000-2010 têm também demonstrado grande emergência de cepas resistentes (SHIFERAW et al., 2012). Em 2013, foi reportado o primeiro surto diarreico causado por *Shigella* spp resistentes a azitromicina nos EUA (KARLSSON et al., 2013).

No Brasil, diversos estudos já demonstraram a resistência de cepas de *Shigella* spp. à combinação sulfametoxazol-trimetoprima, além de resistência à tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol (BASTOS et al., 2011; DE PAULA et al., 2010; DINIZ-SANTOS et al., 2005; NUNES et al., 2012; PEIRANO et al., 2006; SILVA et al., 2008). Não houve relatos de desenvolvimento de resistência a quinolonas.

Um resumo da prevalência global da resistência de *Shigella* spp a antimicrobianos desde 1940 até 2010 pode ser visualizada na FIGURA 4, com base em 96 estudos diferentes. Esta evolução mostra que a resistência a antimicrobianos de maior espectro, como ciprofloxacina, azitromicina e ceftriaxona, está ganhando mais destaque nos últimos anos (KLONTZ et al., 2015).

**FIGURA 4: Prevalência global da resistência de *Shigella* a antimicrobianos de 1940 a 2010.**



Fonte: KLONTZ et. al., 2015

As sulfonamidas começaram a mostrar-se efetivas para o tratamento da shigelose no final da década de 1930 após a realização de estudos clínicos. Neste contexto, a sulfadiazina era o fármaco mais utilizado. Entretanto, durante as décadas de 1940 e 1950, vários relatos de resistência passaram a questionar a eficácia destes antimicrobianos. Ao final da década de 1940 e começo dos anos 1950, observou-se eficácia terapêutica do uso de estreptomicina intramuscular, cloranfenicol e tetraciclina orais. Esta última foi abandonada em 1960 pelo efeito de descoloração e destruição de dentes em crianças. Contudo, vários relatos de cepas que apresentavam resistência conjunta à tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e sulfonamidas ganharam atenção dos pesquisadores (KLONTZ et al., 2015).

Ao final da década de 1960 e início de 1970, a ampicilina tornou-se o fármaco de escolha para tratamento de shigelose, sendo mais efetiva do que amoxicilina. A resistência a betalactâmicos logo tornou-se evidente. Ao longo da década de 1970, a associação sulfametoxazol-trimetoprima virou alternativa terapêutica para cepas resistentes a ampicilina, quando, na década de 1980, resistência a este fármaco foi identificada em alguns países. Neste contexto, o uso do ácido nalidíxico ganhou destaque em alguns países por alguns anos, sendo atualmente contra-indicado devido ao aparecimento de resistência (KLONTZ et al., 2015).

A resistência ao ácido nalidíxico, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprima levou ao interesse para o uso de fluorquinolonas para o tratamento da shigelose, principalmente após resultados *in vitro* de norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina. Vários estudos do final da década de 1980 e da década de 1990 demonstraram eficácia e segurança do uso de quinolonas em adultos e crianças, sem relatos de artropatias a depender da dosagem terapêutica. Nos últimos anos, emergente resistência a este grupo de fármacos tem sido relatada em alguns locais. Neste contexto, outras opções terapêuticas mais recentes de amplo espectro relatadas em shigelose são azitromicina e ceftriaxona, porém esta última somente para uso parenteral. O desenvolvimento de resistência a estes antimicrobianos também já tem sido relatadas (KLONTZ et al., 2015).

Recentes estudos genéticos têm ajudado na caracterização da aquisição de resistência em *Shigella* spp. Neste contexto, os plasmídios são reconhecidos como principal fonte de resistência, principalmente entre bactérias da Enterobacteriaceae. Os mais prevalentes e caracterizados são: o pequeno plasmídio de 8kb codificador de resistência a sulfonamida, estreptomicina; o plasmídio produtor de betalactamases de amplo espectro; e o plasmídio pKSR100, que codifica resistência contra azitromicina, eritromicina, betalactâmicos e aminoglicosídeos (KLONTZ et al., 2015; THE et al., 2016).

A avaliação de perfis plasmidiais entre diferentes espécies tem demonstrado que a capacidade de desenvolvimento de resistência antimicrobiana é particularmente importante em *S. sonnei*, devido à maior aquisição horizontal de genes de resistência de *E. coli* do ambiente, em relação à *S. flexneri* (QU et al., 2014; ANDERSON et al., 2016; THOMPSON et al., 2015).

### 3. HIPÓTESES

1) Postula-se que a distribuição dos sorogrupos de *Shigella sp.* na população de Fortaleza tenha se modificado nos últimos anos, sendo importante a atualização dos dados para os serviços de vigilância e epidemiologia em saúde pública;

2) Postula-se que a investigação dos genes de virulência dos isolados de *Shigella spp.* de crianças com diarreia e sua associação com dados clínicos e socioeconômicos pode fornecer informações para uma melhor compreensão da patogênese da shigelose envolvida no desenvolvimento de diarreia na população infantil de Fortaleza;

3) Postula-se que a caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Shigella spp.* de crianças com diarreia pode indicar o aparecimento de resistência a antimicrobianos de amplo espectro, como macrolídeos, quinolonas e cefalosporinas de segunda e terceira gerações, contribuindo para o uso de protocolos terapêuticos mais efetivos para o tratamento da shigelose em Fortaleza.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência dos sorogrupos (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*), os genes de virulência e a resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil.

#### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### Objetivos Primários:

- 1) Determinar a prevalência dos sorogrupos *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* entre isolados de *Shigella* spp. obtidos a partir de fezes de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil;
- 2) Desenvolver quatro reações de PCR-Múltiplas para o diagnóstico de genes de virulência de *Shigella* spp. e investigar a distribuição de genes de virulência em isolados de *Shigella* spp. obtidos a partir de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil;
- 3) Avaliar o perfil de resistência antimicrobiana em isolados de *Shigella* spp. obtidos de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil;
- 4) Investigar associações entre virulência e resistência antimicrobiana em isolados de *Shigella* spp. obtidos de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil.

##### Objetivos Secundários:

- 1) Avaliar a distribuição geográfica e sazonalidade das infecções por *Shigella* spp. isoladas de crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil;
- 2) Caracterizar quanto a sexo, idade, renda mensal familiar e manifestações clínicas crianças com diarreia moderada a grave em Fortaleza, Ceará, Brasil;
- 3) Analisar associações de renda mensal familiar e manifestações clínicas das crianças com virulência e resistência antimicrobiana de isolados de *Shigella* spp. obtidos a partir de crianças com diarreia em Fortaleza, Ceará, Brasil.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Considerações éticas

O presente estudo fez parte de um projeto intitulado “Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico das diarreias em uma unidade hospitalar de Fortaleza”, aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, parecer nº. 366/2007 – ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Albert Sabin (HIAS, registro nº. 80/06 – ANEXOS B e C). Todos os responsáveis pelas crianças receberam orientação sobre o projeto antes da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO D).

### 6.2 Desenho do estudo

Crianças com diarreia moderada a grave que necessitaram de atendimento médico de emergência no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e no Centro de Assistência à Criança Dra Lúcia de Fátima R. G. Sá (CAC) no período de maio de 2008 a abril de 2009 foram incluídas neste estudo. O CAC é uma unidade de atendimento de média complexidade, enquanto o HIAS é de alta complexidade, ambos são convenccionados ao Sistema Único de Saúde (SUS) e localizados na zona urbana de Fortaleza, Ceará. A diarreia foi definida como a ocorrência de três ou mais fezes líquidas por, no mínimo, 24 horas anteriores ao recrutamento. Foram excluídas do estudo crianças sob amamentação exclusiva, em uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias e hospitalizadas nas últimas 12 horas, conforme previsto no Formulário de Elegibilidade (ANEXO E).

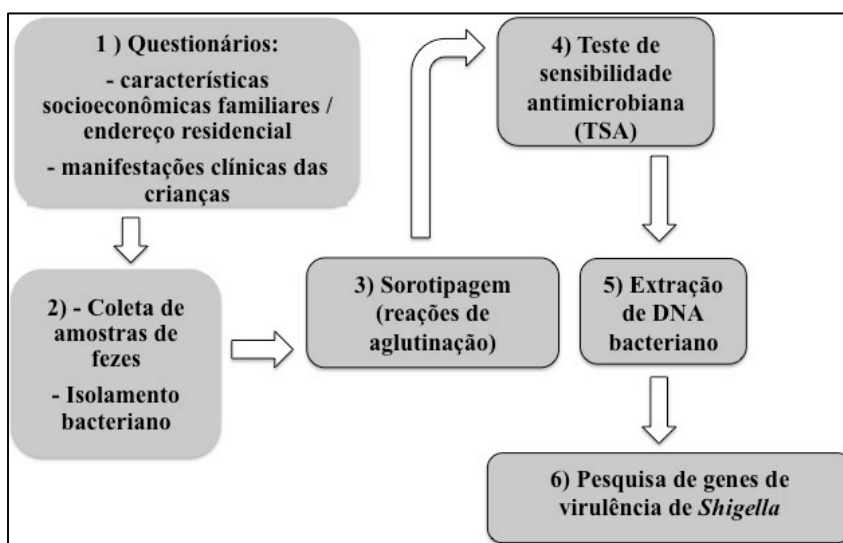
Uma equipe de profissionais de saúde, que incluiu uma enfermeira, técnica de enfermagem e agentes de saúde, foram os responsáveis pelas atividades de campo do presente estudo, que incluiu o recrutamento dos participantes, a aplicação de formulários (para documentação das informações obtidas) e coletas das amostras fecais. Após a obtenção do TCLE assinado pelos pais e responsáveis, os questionários foram aplicados pelas equipes de campo.

O projeto teve como objetivo investigar a etiologia bacteriana da diarreia em Fortaleza, Ceará a partir de análises realizadas no IBISAB/UFC. Detectou-se importantes agentes etiológicos de diarreias bacterianas, como *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* Destes, *Shigella sp.* foi o agente identificado em maior frequência (QUETZ et al., 2012) sendo, por esta razão, escolhido como patógeno para

investigação molecular mais aprofundada no presente estudo. O número de amostras com *Shigella* sp. isoladas foi de 63.

A ordem de execução das etapas do presente estudo pode ser visualizada na FIGURA 5.

**FIGURA 5: Fluxograma das etapas do presente estudo, desde a aplicação de questionários, até coleta e processamento das fezes, sorotipagem, teste de sensibilidade a antimicrobianos e pesquisa de genes de virulência**



### 6.3 Avaliação das sociodemografia, renda mensal e manifestações clínicas da população

As informações sobre manifestações clínicas (febre, vômito, dor abdominal e presença de sangue nas fezes), renda mensal familiar, endereço de residência e dados sociodemográficos de sexo e data de nascimento dos participantes foram coletadas a partir de questionários padronizados. Os questionários 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).

### 6.4 Avaliação da localização geográfica e sazonalidade

Para a análise de localização geográfica da shigelose no estudo, o endereço de residência das crianças infectadas foi inserido no software Google Earth versão 7.1.2.2041 (Google Inc., EUA). A preparação dos mapas foi realizada a partir do software ArcMAP versão 10.0 (ESRI, EUA). As coordenadas geográficas foram exportadas para o ArcMAP por meio do software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, EUA).



A análise da distribuição geográfica dos sorogrupos de *Shigella* por mapa de calor foi realizada pelo método de estimativas da densidade de Kernel. Este algoritmo calcula a densidade de fatores ao redor de proximidades, diferenciando pontos de alta densidade de pontos de baixa densidade.

A avaliação dos bairros de Fortaleza quanto ao Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) foi realizada de acordo com os dados disponibilizados pela Prefeitura de Fortaleza e pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2010 (PREFEITURA DE FORTALEZA, 2010).

A distribuição pluviométrica de Fortaleza foi verificada em consulta no endereço eletrônico da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) para o período de estudo, sendo comparada com a incidência de shigelose detectada.

### **6.5 Isolamento e identificação de *Shigella* spp.**

O isolamento e identificação de *Shigella* spp. foi previamente realizado por outro estudo. Em resumo, a coleta das fezes foi realizada em frascos coletores estéreis e transportadas em até no máximo 4 horas após a coleta, em condições refrigeradas, para o setor de Microbiologia do Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Ceará (LDI-UFC), onde foram submetidas a técnicas microbiológicas padronizadas. Cada amostra foi semeada em meios de cultura específicos para a detecção de diferentes enterobactérias. Os meios seletivos diferenciais utilizados para o diagnóstico de *Shigella* spp. incluíram ágar MacConkey (MAC), ágar Entérico de Hektoen (HE) e ágar *Salmonella/Shigella* (SS), além do caldo de enriquecimento Selenito. As colônias com morfologia característica foram submetidas a testes bioquímicos por meio do sistema de identificação API20E (*BioMerieux. Durham, NC*). Todos os isolados de *Shigella* spp. foram armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  em caldo triptona de soja (TSB) acrescido de 15% de glicerol até a realização dos testes adicionais.

### **6.6 Identificação de sorogrupos**

Todos os 63 isolados de *Shigella* foram descongelados por meio de cultivo nos meios ágar sangue e MAC. Com o intuito de reduzir ao máximo a possibilidade de perda e/ou transferência de genes plasmidiais, as cepas foram descongeladas uma única vez e submetidas aos testes em sequência.

Para confirmação das espécies, os isolados foram caracterizados antigenicamente por meio de reações de aglutinação com antisoros polivalentes específicos, de acordo com as instruções do fabricante (Probac do Brasil, São Paulo, SP).

### **6.7 Extração do DNA bacteriano**

O DNA bacteriano foi extraído a partir das colônias isoladas pelo método de ebulição, de acordo com Lima *et al.* (2012). Duas a três colônias foram dissolvidas em 1 mL de água deionizada do tipo *MilliQ* (Millipore – Billerica, MA, USA) autoclavada com 5 µL de Triton X-100. Após agitação por 5 segundos, a mistura foi submetida à fervura durante 20 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação (956 x g por 10 minutos) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até sua utilização na PCR como DNA molde.

### **6.8 Pesquisa de genes de virulência**

Para a investigação de 16 genes de virulência de *Shigella* spp. (TABELA 1), quatro reações de PCR múltiplas foram propostas. Isolados de *S. flexneri*, *Escherichia coli* enteroagregativa cepa H223-1 e *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 foram utilizados como controles positivos (TABELA 2), enquanto que água *MilliQ* autoclavada serviu como controle negativo. Os iniciadores e suas temperaturas de anelamento estão descritos na TABELA 2. 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 (Ta), o número de ciclos e a concentração dos iniciadores. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídio para visualização e fotodocumentação sob luz ultravioleta (UV).

**TABELA 1 - Genes e seus respectivos produtos proteicos analisados no estudo**

Gene	Produtos proteicos
<i>ipaH</i>	Antígeno plasmidial de invasão
<i>ial</i>	Proteína de invasão
<i>virB</i>	Regulador do <i>ial</i>
<i>virF</i>	Regulador do <i>virB</i>
<i>ipaA</i>	Antígeno plasmidial de invasão A
<i>ipaB</i>	Antígeno plasmidial de invasão B
<i>ipaC</i>	Antígeno plasmidial de invasão C
<i>ipaD</i>	Antígeno plasmidial de invasão D
<i>sepA</i>	Protease / indutor inflamatório
<i>icsB</i>	Prevenção do reconhecimento autofágico
<i>icsA</i>	Proteína controladora da mobilidade via actina
<i>pic</i>	Protease Pic – atividade de mucinase
<i>sigA</i>	Protease SigA – atividade de hemaglutinação
<i>set</i>	Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i> (Shet1)
<i>sen</i>	Enterotoxina 2 de <i>Shigella</i> (Shet2)
<i>stx</i>	Toxina Shiga

**TABELA 2 - Relação das cepas bacterianas utilizadas como controle positivo para as reações de PCR e os respectivos genes.**

Cepa controle	Genes
Cepa de <i>Shigella flexneri</i>	<i>ipaH, set, virF, sen, ial, icsB, virB, icsA, ipaA-D</i>
<i>E. coli</i> enteroagregativa H223-1	<i>sigA, pic e sepA</i>
<i>E. coli</i> enterohemorrágica O157:H7	<i>Stx</i>

**TABELA 3 - Genes alvo, iniciadores, tamanhos dos produtos obtidos, temperaturas de anelamento das reações múltiplas para investigação dos genes de virulência de *Shigella* spp..**

Reações de PCR múltiplas	Gene alvo	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produtos de PCR (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
1	<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAAATTATTCC	320	57°C	Frankel <i>et al.</i> , 1989 Lüscher e Altwegg, 1994 Adaptado de Farfán <i>et al.</i> , 2010 Vidal <i>et al.</i> , 2005
	<i>ipaH</i>	TGGAAAACTCAGTGCCTCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	422		
	<i>set</i>	TCCCTTCATACTGGCTCCTG AACACTCTGTGGGGGAACAG	553		
	<i>virF</i>	AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	618		
2	<i>sen</i>	ATTCCTTGAGGCCAGCAAA GGAAGGAATGGGAGGACGAA	296	58°C	Este estudo Boisen <i>et al.</i> , 2009 Restieri <i>et al.</i> , 2007 Restieri <i>et al.</i> , 2007
	<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	430		
	<i>pic</i>	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT GACTTAATGTCACGTTCAGCG	570		
	<i>sepA</i>	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	789		
3	<i>stx</i>	TTCTGGGAAGCGTGGCATT CATCAGAATTGCCCCAGAG	167	60°C	Este estudo Este estudo Este estudo Este estudo
	<i>icsB</i>	GGCCTGCATCAAGTCTTTCG GGCATCGGTACAGCCAAAAA	280		
	<i>virB</i>	CGCGGAGACAGATTCTCTT TGGTGGATTTGTGCAACGAC	488		
	<i>icsA</i>	AGATGGAATGGATGCGTGGT CCCAATGTCCACCATTACCG	626		
4	<i>ipaC</i>	CCTCACCACAACTAAGTCTAGCA GAGAAGTTTTATGTTTCAGTTGACAGGGATA	93	60°C	Moreno <i>et al.</i> , 2009 Este estudo Este estudo Este estudo
	<i>ipaB</i>	CAAGCCCTGAATCCGATCAT TGCTGCTGCCTGTTTACCAA	204		
	<i>ipaD</i>	AAGAAGCCGAGCTTGATGGAG CCTCGCCATTTCCACCTAGA	450		
	<i>ipaA</i>	CCTGTGTCCCCGAGAAAGAGA TGACGCACAGGCAAACTTG	628		

### 6.9 Determinação da resistência antimicrobiana

Testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer, de acordo com o manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A preparação do inóculo foi realizada transferindo colônias para a formação de uma suspensão bacteriana com turbidez de uma solução de McFarland de 0,5, sendo semeada em placa de ágar Mueller-Hinton com swab estéril. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram postos na superfície das placas inoculadas, sendo estas incubadas a 35°C por 16-18h. A medição dos diâmetros dos halos de inibição foi realizada e comparada com os pontos de corte especificados nas normas do CLSI, classificando a cepa bacteriana como sensível, resistente ou intermediário contra cada antimicrobiano específico (TABELA 4). Foram empregadas placas de ágar Mueller-Hinton e discos antimicrobianos disponíveis comercialmente. Os seguintes agentes foram testados: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol/trimetoprima, cefalotina, ceftriaxona, cefuroxima, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, tetraciclina e azitromicina. A seleção dos antimicrobianos foi baseada nas recomendações da OMS, ESPGHAN, CLSI e Ministério da Saúde Brasileiro para o tratamento de shigelose. As cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e 35218 foram utilizadas como controle de qualidade dos antimicrobianos ao longo do estudo.

**TABELA 4 – Pontos de corte dos diâmetros do halo de inibição para interpretação e classificação em sensível, intermediário e resistente.**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Diâmetro do halo de inibição (mm): Sensível</b>	<b>Diâmetro do halo de inibição (mm): Intermediário</b>	<b>Diâmetro do halo de inibição (mm): Resistente</b>
<b>Azitromicina</b>	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$
<b>Amox+Clavulonato</b>	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$
<b>Cefuroxime</b>	$\geq 18$	15-22	$\leq 14$
<b>Cefalotina</b>	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$
<b>Amicacina</b>	$\geq 17$	15-16	$\leq 14$
<b>Ampicilina</b>	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$
<b>Ceftriaxona</b>	$\geq 23$	20-22	$\leq 19$
<b>Cloranfenicol</b>	$\geq 18$	13-17	$\leq 12$
<b>Ciprofloxacina</b>	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
<b>Gentamicina</b>	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$
<b>Ác. Nalidíxico</b>	$\geq 19$	14-18	$\leq 13$
<b>Sulfa + Trimetoprima</b>	$\geq 16$	11-15	$\leq 10$
<b>Tetraciclina</b>	$\geq 15$	12-14	$\leq 11$

## 6.10 Análise de dados

As variáveis do estudo (renda mensal familiar, localização geográfica, classificação em sorogrupos, presença de genes de virulência e resistência a antimicrobianos) foram analisadas, utilizando teste exato de Fisher ou teste de correlação de Pearson, considerando como significância os valores de  $P < 0,05$ . Para a análise descritiva dos dados foram empregadas tabelas e figuras. Para a interpretação dos dados do teste de sensibilidade a antimicrobianos, a classificação “não sensível” (que engloba intermediário e resistente) foi considerada como resistente. Foi utilizado o *GraphPad Prism* (*GraphPad software*, versão 5.01, San Diego, CA, EUA) para a construção dos gráficos e testes estatísticos.

A análise de combinações de genes de virulência associadas às manifestações clínicas das crianças foi realizada por meio do programa CART (*Classification and Regression Tree*) (Salford Systems). As árvores de decisão foram construídas a partir de divisão das amostras em nós, de modo a maximizar a homogeneidade dos nós em relação a cada prevalência de genes. Para a análise da associação entre virulência e resistência antimicrobiana, empregou-se o corte de 12 genes de virulência (80% dos genes analisados neste estudo) para classificação das cepas que apresentam alta ou baixa virulência.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterização demográfica da população

As 63 crianças diagnosticadas com infecção por *Shigella* spp. corresponderam a 16,4% da população total do projeto original. Desta população, apenas uma criança não teve formulário preenchido, não sendo possível a obtenção de seus dados epidemiológicos e clínicos. 50% das crianças estudadas (31/62) foram do sexo masculino. Quanto à idade, 13% delas (8/62) tinham menos do que 1 ano, 16% (10/62) de 1 a 2 anos, 13% (8/62) de 2 a 3 anos, 14,5% (9/62) de 3 a 4 anos, 6,5% (4/62) de 4 a 5 anos e 37% (23/62) acima de 5 anos. A distribuição dos sexos entre os diferentes grupos etários foi homogênea (TABELA 5).

**TABELA 5 – Caracterização quanto ao gênero e idade das crianças com diarreia diagnosticadas com *Shigella* spp.**

	Sexo masculino	Sexo feminino	Total
<b>Idade</b>			
< 2 anos	11	7	18 (29%)
2-5 anos	10	11	21 (34%)
> 5 anos	10	13	23 (37%)
<b>Total</b>	31 (50%)	31 (50%)	62

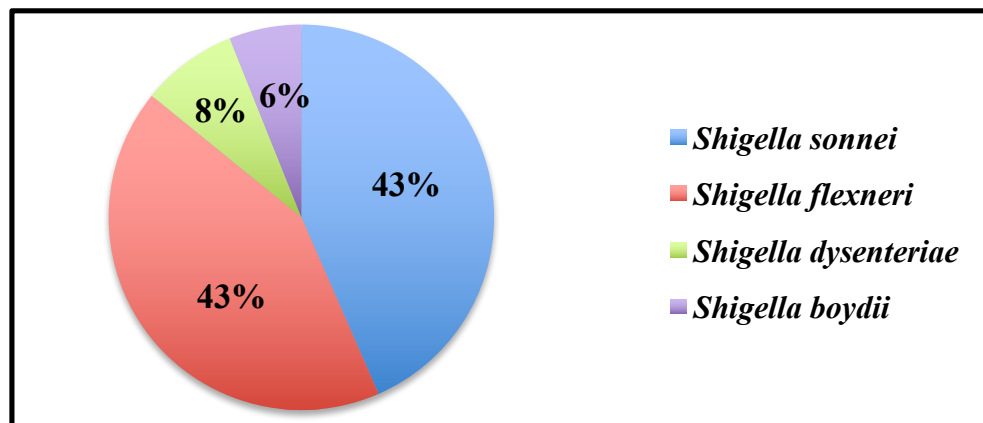
\*Não foi possível obter o dado de uma criança

### 7.2 Distribuição dos sorogrupos de *Shigella* spp.

Dentre os 63 isolados de *Shigella* spp. investigados no estudo, 27 (43%) foram identificados como *Shigella sonnei*, 27 (43%) como *Shigella flexneri*, 5 (8%) como *Shigella dysenteriae* e 4 (6%) como *Shigella boydii* (GRÁFICO 1).



**GRÁFICO 1 - Distribuição dos sorogrupos de *Shigella* spp no estudo.**



### 7.3 Análise da renda mensal e sorogrupos de *Shigella* spp.

A renda mensal familiar das crianças teve média de R\$ 579,39, sendo que 55% (32/58) das famílias viviam com renda maior do que um salário mínimo da época (R\$ 440,00) e 45% (26/58) com renda menor que um salário mínimo da época. Não foi possível obter a renda mensal familiar de quatro crianças. A TABELA 6 abaixo descreve estes dados com maiores detalhes.

**TABELA 6 – Caracterização quanto ao sexo e renda mensal familiar das crianças com diarreia infectadas por *Shigella* spp.**

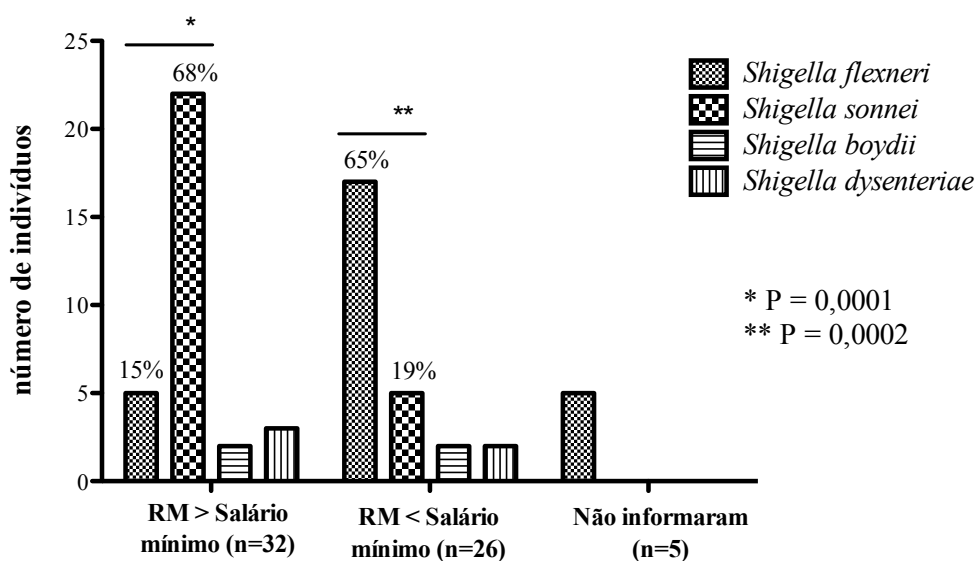
	Sexo masculino	Sexo feminino	Total
<b>Renda mensal</b>			
> Salário mínimo	17	15	32 (55%)
< Salário mínimo	11	15	26 (45%)
<b>Total</b>	28	30	58*

\*Não foi possível obter os dados de renda familiar de 4 crianças

Quando comparadas as rendas mensais das famílias as quais pertenciam as crianças do estudo em relação aos sorogrupos de *Shigella* investigados, percebeu-se uma maior frequência de *Shigella sonnei* (68% - 22/32) em crianças com renda mensal familiar maior que um salário mínimo da época, enquanto que houve maior frequência de *Shigella flexneri* (65% - 17/26) em crianças com renda mensal familiar menor que o salário mínimo (GRÁFICO 2). O sorogrupo *S. flexneri* mostrou associação com a renda mensal familiar menor do que um salário mínimo, com  $P = 0,0001$  e risco relativo = 4,185 e IC 95% = 1,784 a 9,815, enquanto o sorogrupo *S.*

*sonnei* mostrou associação com renda mensal familiar maior do que o salário mínimo, com  $P = 0,0002$ , risco relativo = 3,575 e IC 95% = 1,572 a 8,132. Em relação às médias da renda mensal familiar referente às infecções por estes dois sorogrupos, as crianças infectadas por *S. flexneri* apresentavam em média renda de R\$ 462,22 enquanto as crianças infectadas por *S. sonnei* apresentavam em média renda de R\$ 681,11. Tal observação mostra um aumento de quase metade do salário mínimo da época nas famílias das crianças infectadas por *S. sonnei* em relação à *S. flexneri*.

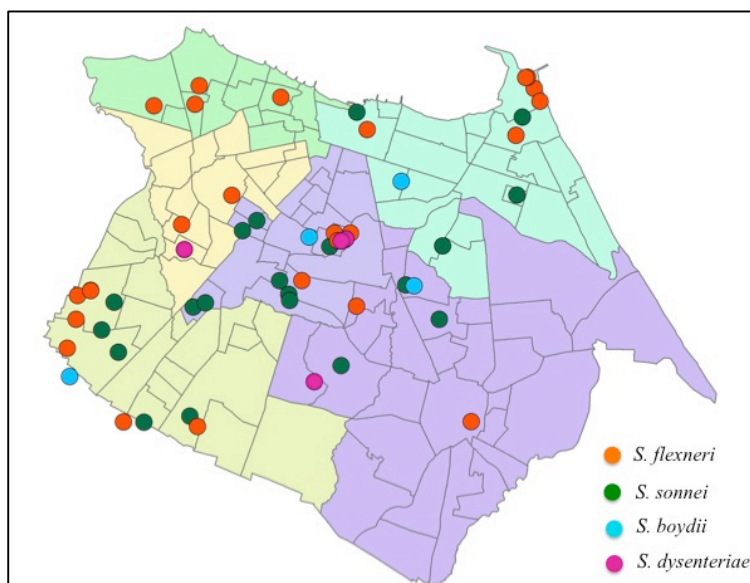
**GRÁFICO 2 - Distribuição dos sorogrupos de *Shigella* spp. quanto a renda mensal familiar das crianças do estudo.**



#### 7.4 Distribuição geográfica das crianças e sorogrupos de *Shigella* spp.

A análise da localização geográfica da shigelose mostrou uma distribuição variada das cepas de *Shigella* spp. por toda a região de Fortaleza, Ceará, com pontos em todas as regionais da cidade (FIGURA 6).

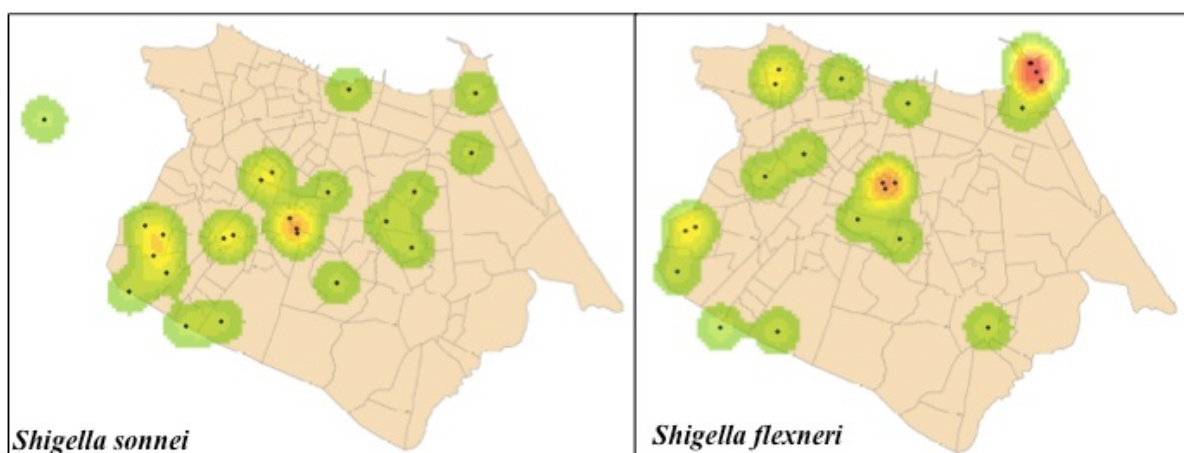
**FIGURA 6: Distribuição geográfica das crianças infectadas por cepas de *Shigella spp.* do estudo no mapa de Fortaleza.**



Cada região diferenciada por cores corresponde a regionais do município de Fortaleza

A comparação da distribuição dos focos de infecção pelas espécies mais prevalentes (*S. flexneri* e *S. sonnei*) mostrou distintas localizações dos focos a partir do mapa de calor (FIGURA 7). *S. sonnei* apresentou como focos os bairros Granja Lisboa, Bom Jardim, Itaperí e Serrinha, enquanto *S. flexneri* mostrou-se mais presente nos bairros Cais do Porto e Vila União.

**FIGURA 7: Distribuição geográfica das crianças infectadas por cepas de *S. sonnei* e *S. flexneri* do estudo em mapas de calor por densidade de Kernel.**



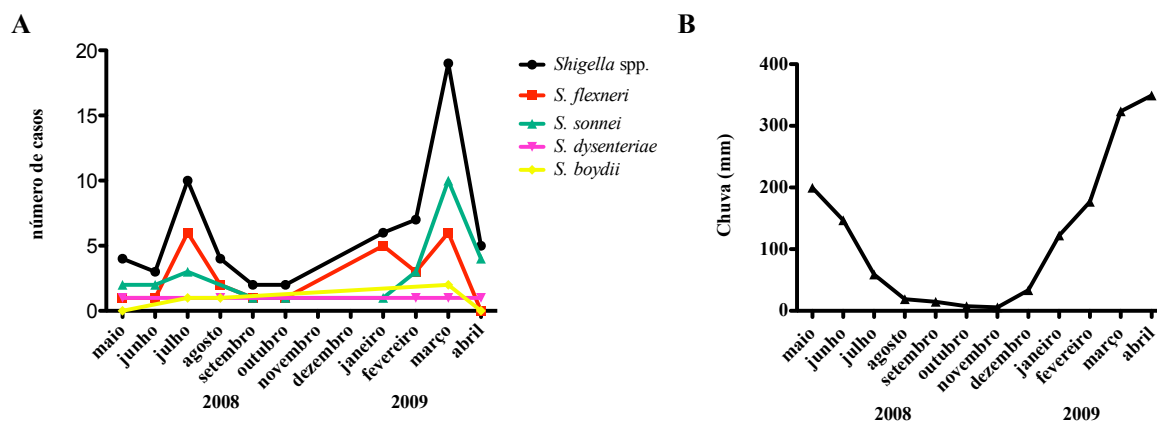
A avaliação da distribuição geográfica dos pontos de shigelose, considerando o IDH de cada bairro disponibilizado pela prefeitura de Fortaleza, mostrou que 26% das crianças que

apresentavam residência em bairros com IDH maior ou igual a 0.3501 (classificado como médio, alto ou muito alto) foram infectadas por *S. flexneri*. Além disso, em bairros com IDH menor do que 0.3501 (classificado como baixo ou muito baixo), a frequência de infecção por *S. flexneri* subiu para 50%. A análise estatística de correlação entre infecções por *S. flexneri* e crianças que moravam em bairros com IDH baixo não mostrou significância. Além disso, não houve nenhum caso de shigelose no estudo em crianças com residência em bairros com IDH acima de 0.8, a mais alta classificação de acordo com o IBGE (correspondente aos bairros Meireles, Aldeota e Dionísio Torres).

### 7.5 Avaliação da sazonalidade dos isolados de *Shigella* spp.

A análise da ocorrência de casos de shigelose em relação ao período anual indica a ocorrência de picos de incidência em períodos chuvosos. Ao comparar as duas espécies mais prevalentes, *S. flexneri* mostrou um comportamento mais regular ao longo do ano, enquanto *S. sonnei* mostrou maior pico em março e abril de 2009, permanecendo com poucos casos durante o resto do ano. *S. dysenteriae* e *S. boydii* apresentaram distribuição pequena e homogênea ao longo do ano. A associação entre distribuição pluviométrica em Fortaleza e a ocorrência de *Shigella* spp. foi obtida com R de Pearson = 0,6136 com P = 0,0338. O GRÁFICO 3 mostra a distribuição de casos de *Shigella* spp e de chuvas no período do estudo.

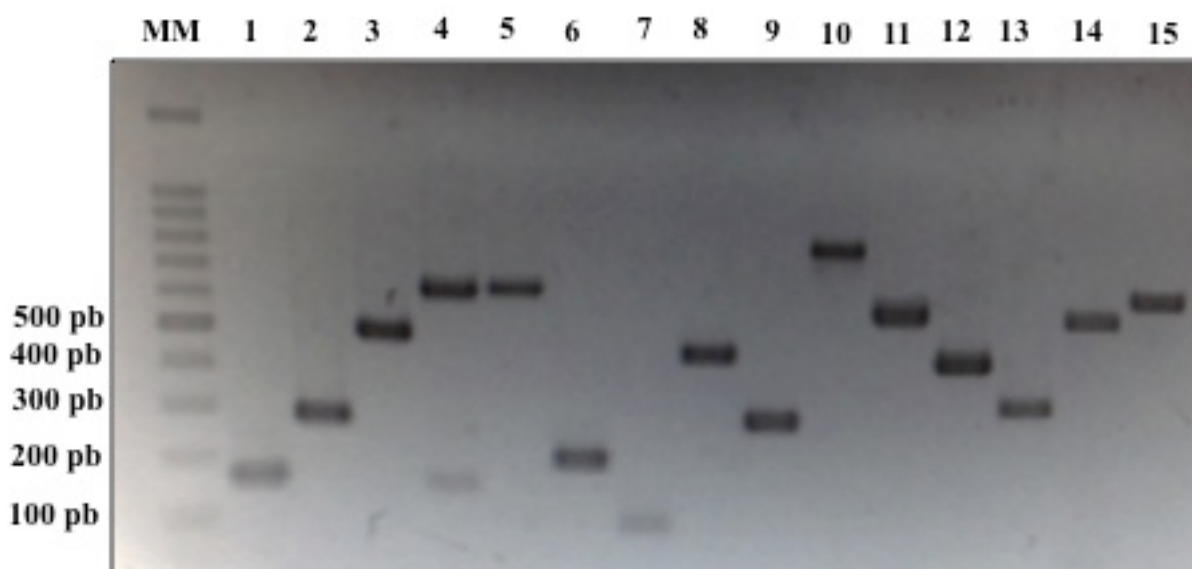
**GRÁFICO 3: Avaliação da infecção por *Shigella* spp. e sorogrupos quanto à distribuição pluviométrica em Fortaleza no período do estudo. A) Número de casos totais de *Shigella* sp. e de cada sorogrupo (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*) durante o período de estudo e B) Distribuição pluviométrica da cidade de Fortaleza durante o período de estudo.**



### 7.6 Desenvolvimento de reações de PCR multiplex para detecção de genes de virulência

Para o desenvolvimento das quatro reações de PCR múltiplas, os 16 pares de iniciadores específicos para cada gene-alvo foram testados previamente com seus respectivos controles positivos separadamente, mostrando especificidade, com bandas nítidas, previstas e amplificadas em protocolos viáveis (FIGURA 8). Após esta etapa, uniram-se os iniciadores em cada grupo de reação, de acordo com a TABELA 3, para o desenvolvimento das reações múltiplas.

**FIGURA 8 - Fotodocumentação de gel de agarose com os produtos de PCR representativa do teste de validação dos iniciadores com seus respectivos controles positivos.**

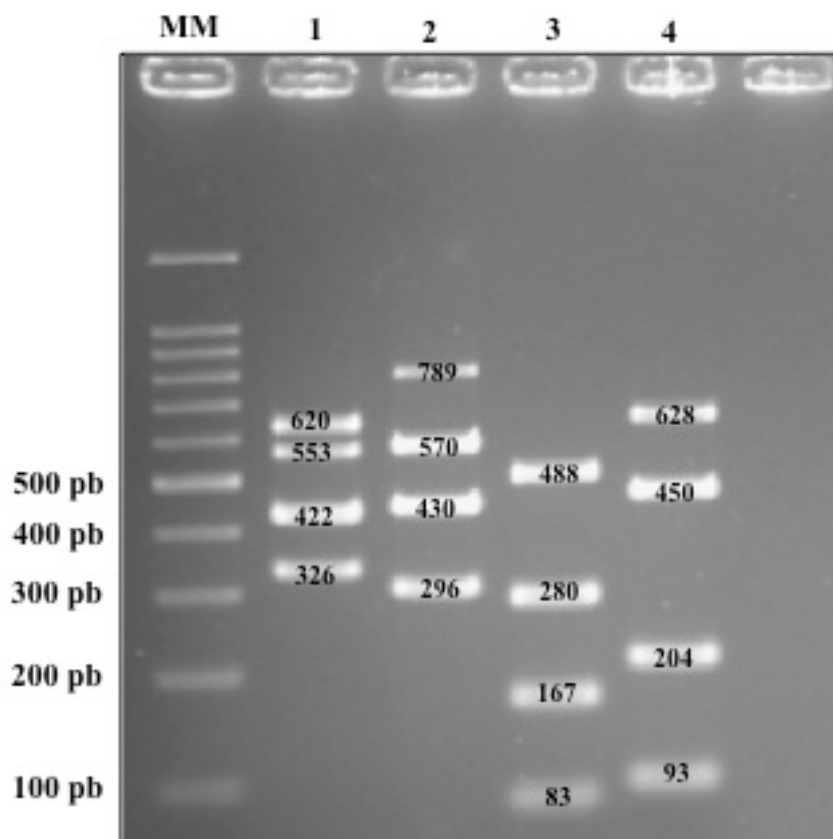


MM = Marcador Molecular 100pb, 1: *stx* (167 pb), 2: *icsB* (280 pb), 3: *virB* (488 pb), 4: *icsA* (626 pb), 5: *ipaA* (628 pb), 6: *ipaB* (204 pb), 7: *ipaC* (93 pb), 8: *ipaD* (450 pb), 9: *sen* (296 pb), 10: *sepA* (789 pb), 11: *pic* (570 pb), 12: *sigA* (430 pb), 13: *ial* (320 pb), 14: *set* (553 pb), 15: *virF* (618 pb).

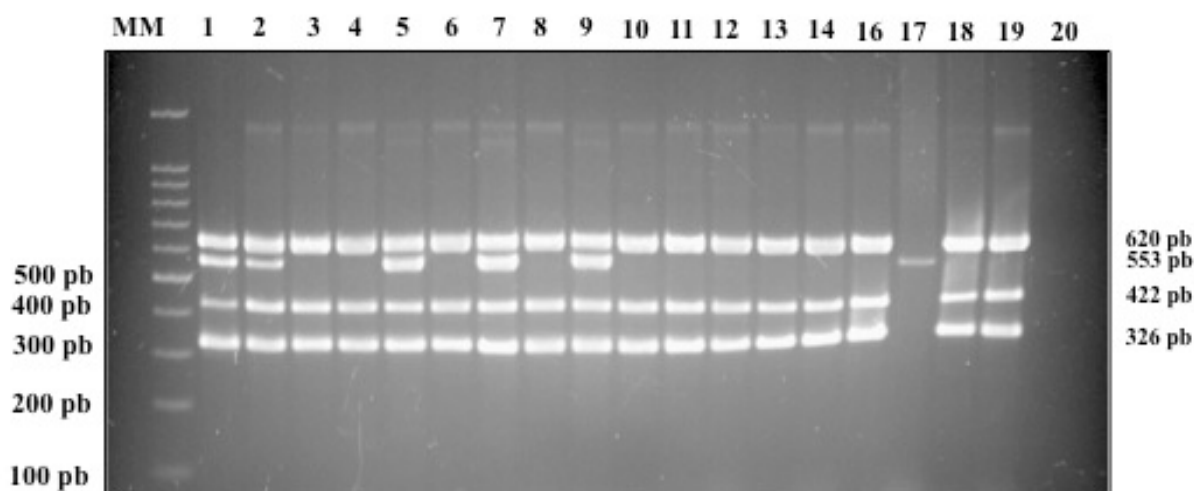
Após as fases de otimização e testes de temperaturas, as reações de PCR múltiplas seguiram o referido protocolo: 95°C a 15min; 35 ciclos de 94°C por 45s, Ta por 45s e 72°C por 1min; e 72°C por 10min. A Ta foi específica para cada reação de PCR múltiplo, como mostrado na TABELA 3. Utilizaram-se iniciadores na concentração de 0,1µM. A FIGURA 9 mostra a representação dos padrões das bandas das PCR múltiplas 1, 2, 3 e 4. Foi utilizado marcador molecular de 100pb e os tamanhos das bandas estão descritos na TABELA 3. Após a

padronização, a técnica foi utilizada para o diagnóstico das amostras do estudo. A FIGURA 10 mostra fotodocumentação de gel de agarose referente à PCR múltipla 1 (genes *ial*, *ipaH*, *set* e *virF*) realizado em amostras do estudo.

**FIGURA 9 - Fotodocumentação de gel de agarose a 3% com os produtos das PCR múltiplas 1, 2, 3 e 4.**



**FIGURA 10 - Fotodocumentação representativa de gel de agarose a 3% com os produtos da PCR múltipla 1 em amostras do estudo.**



MM = Marcador Molecular 100pb, 620 pb = *virF*; 553 pb = *set*; 422 pb = *ipaH*; 326 pb = *ial*. Colunas 1, 2, 5, 7, 9: amostras positivas para os genes *ial*, *ipaH*, *set* e *virF*. Colunas 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19: amostras positivas para os genes *ial*, *ipaH* e *virF*. Coluna 17: amostra positiva para o gene *set*. Coluna 20: controle negativo.

### 7.7 Distribuição dos genes de virulência entre os isolados de *Shigella* spp.

Em relação ao diagnóstico dos genes de virulência, percebeu-se elevada frequência dos genes analisados nos isolados do estudo (n=63) (TABELA 7). Grande porção dos isolados, 97% (61/63), possuíam pelo menos 75% dos genes de virulência da análise (12/16). Além disso, 60% (38/63) possuíam mais de 80% (13/16). O gene *ipaH*, os genes plasmidiais de invasão (*ipaA*, *B* e *C*) e o *icsA* foram detectados em todos os isolados testados. Os genes *sen*, *icsB* e *virB* foram diagnosticados em 98% das amostras (62/63). Os genes *ial* e *virF* foram detectados em 97% (61/63), enquanto os genes *sigA*, *sepA*, *set*, *pic* e *Stx* foram detectados em 84% (53/63), 76% (48/63), 34% (22/63), 31% (20/63) e 0%, respectivamente.

Todas as *S. sonnei*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae* foram positivas para os genes *sen*, *icsB* e *virB*; e mais de 85% delas foram positivas para *ial*, *virF* e *sigA* (TABELA 7). Dentre os sorogrupos analisados, *S. boydii* e *S. dysenteriae* mostraram composição mais variada dos genes de virulência, provavelmente devido ao número amostral pequeno.

**TABELA 7 - Detecção dos genes de virulência em *Shigella spp.* isoladas de fezes de crianças em Fortaleza, Ceará, Brasil.**

<b>Genes de virulência</b>	<b>Nº total de isolados <i>Shigella spp</i> n=63 (100%)</b>	<b>Nº de isolados <i>S. sonnei</i> n=27</b>	<b>Nº de isolados <i>S. flexneri</i> n=27</b>	<b>Nº de isolados <i>S. dysenteriae</i> n=5</b>	<b>Nº de isolados <i>S. boydii</i> n=4</b>
<i>ial</i>	61 (97%)	26 (96%)	27 (100%)	5 (100%)	3 (75%)
<i>ipaH</i>	63 (100%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
<i>set</i>	22 (34%)	3 (11%)	18 (66%)	0 (0%)	1 (25%)
<i>virF</i>	61 (97%)	26 (96%)	27 (100%)	5 (100%)	3 (75%)
<i>sen</i>	62 (98%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	3 (75%)
<i>sigA</i>	53 (84%)	23 (85%)	23 (85%)	4 (80%)	3 (75%)
<i>pic</i>	20 (31%)	3 (11%)	17 (63%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>sepA</i>	48 (76%)	15 (56%)	27 (100%)	4 (80%)	2 (50%)
<i>ipaA</i>	63 (100%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
<i>ipaB</i>	63 (100%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
<i>ipaC</i>	63 (100%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
<i>ipaD</i>	63 (100%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
<i>stx</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>icsB</i>	62 (98%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	3 (75%)
<i>virB</i>	62 (98%)	27 (100%)	27 (100%)	5 (100%)	3 (75%)
<i>icsA</i>	63 (100%)	27 (100%)	26 (100%)	5 (100%)	4 (100%)



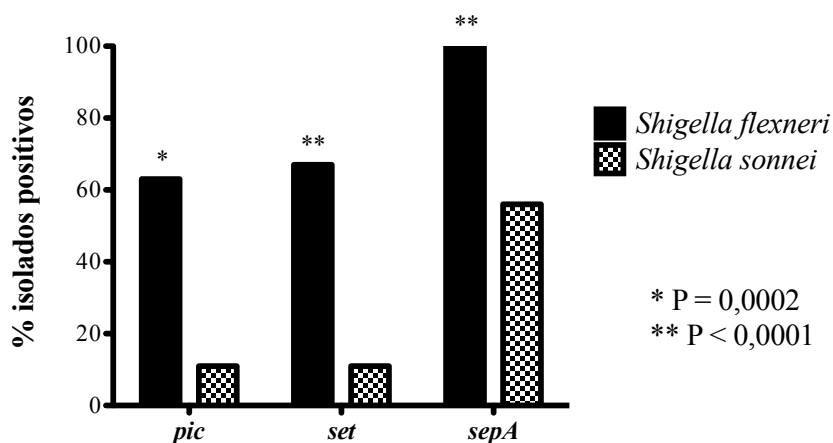
O sorogrupo *S. flexneri* apresentou maior frequência dos genes de virulência, em média 14,1 genes, ou 88,4% dos genes, enquanto *S. sonnei* apresentou 12,5 genes, ou 78,5% dos genes. Os sorogrupos *S. dysenteriae* e *S. boydii* apresentaram em média 12,6 (78,7%) e 11,2 (70,3%) genes, respectivamente. Uma distribuição mais detalhada pode ser visualizada na TABELA 8. Observou-se associação entre *S. flexneri* e a frequência de pelo menos 13 genes de virulência analisados, com  $P < 0.0001$ , risco relativo = 2.215 e IC 95% = 1.482 a 3.312, além de associação entre *S. sonnei* e frequência menor do que 13 genes de virulência analisados, com  $P = 0.0017$ , risco relativo = 2.833 e IC 95% = 1.441 a 5.572.

**TABELA 8 – Caracterização quanto à quantidade de isolados de *Shigella* spp. e o número de genes de virulência detectados**

Sorogrupos	Número de genes de virulência						Total
	8	11	12	13	14	15	
<i>S. flexneri</i>	0	0	4	5	1	17	27
<i>S. sonnei</i>	0	0	17	7	1	2	27
<i>S. boydii</i>	1	1	0	2	0	0	4
<i>S. dysenteriae</i>	0	0	2	3	0	0	5
<b>Total</b>	1	1	23	17	2	19	63

Analisando os dois sorogrupos mais prevalentes, os genes *pic*, *set* e *sepA* foram mais detectados em *S. flexneri* do que em *S. sonnei* (*pic*: 63% vs. 11%,  $P = 0.0002$ , com risco relativo = 7.556 e IC 95% = 2.461 a 23.19; *set*: 67% vs. 11%,  $P < 0.0001$ , com risco relativo = 6.000 e IC 95% = 2.293 a 15.70; *sepA*: 100% vs. 56%,  $P = 0.0001$ , risco relativo = 1.714 e IC 95% = 1.301 a 2.260 (GRÁFICO 4).

**GRÁFICO 4 - Distribuição dos genes *pic*, *set* e *sepA* entre isolados de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri***



### 7.8 Avaliação da resistência a antimicrobianos entre os isolados de *Shigella* spp.

O fenótipo de resistência a pelo menos um fármaco foi observado em 97% (61/63) dos isolados de *Shigella* spp.. A maior taxa de resistência foi para a combinação sulfametoxazol-trimetoprima (82,5%, 52/63), seguida de tetraciclina (79,4%, 50/63) e ampicilina (60,3%, 38/63). Taxas moderadas de resistência foram encontradas para cloranfenicol (47,61% - 30/63), azitromicina (20,63% - 13/63), amoxicilina/ácido clavulônico (15,87% - 10/63) e cefalotina (9,52% - 6/63). As cepas não apresentaram resistência aos antimicrobianos gentamicina, amicacina, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacino e ácido nalidíxico (TABELA 9).

**TABELA 9 - Antimicrobianos analisados e as taxas de isolados de *Shigella* spp. resistentes.**

<b>Antimicrobianos</b>	<b>% de resistência (n = 63)</b>
<b>SXT</b>	82% (52/63)
<b>TET</b>	79% (50/63)
<b>AMP</b>	60% (38/63)
<b>CLO</b>	48% (30/63)
<b>AZT</b>	21% (13/63)
<b>AMC</b>	16% (10/63)
<b>CEF</b>	9% (6/63)
<b>CN</b>	0%
<b>AK</b>	0%
<b>NA</b>	0%
<b>CIP</b>	0%
<b>CRO</b>	0%
<b>CXM</b>	0%
<b>Sensível a todos</b>	3% (2/63)

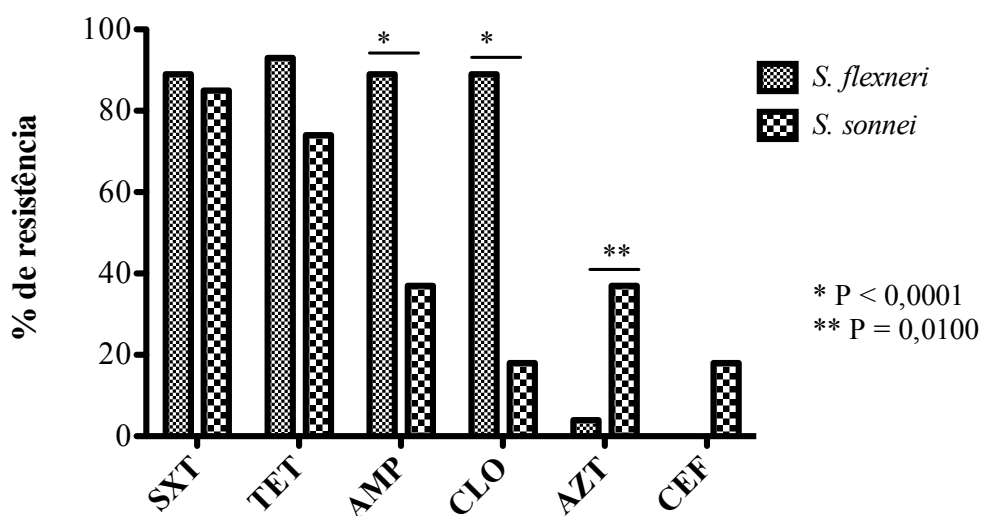
NA = ácido nalidíxico, AK = amicacina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, AMP = ampicilina, AZT = azitromicina, CEF = cefalotina, CRO = ceftriaxona, CXM = cefuroxima, CIP = ciprofloxacino, CLO = cloranfenicol, CN = gentamicina, SXT = sulfametoxazol-trimetoprima, TET = tetraciclina.

O fenótipo de resistência antimicrobiana variou entre os diferentes sorogrupos de *Shigella*. Cepas de *S. sonnei* foram resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol em 85% (23/27), 74% (20/27), 37% (10/27) e 18% (5/27) dos isolados, respectivamente, enquanto a resistência a estes fármacos foi maior entre os isolados de *S. flexneri*, sendo 93% (25/27) para tetraciclina e 89% (24/27) para os demais.

Observou-se associação significativa entre *S. flexneri* e resistência a 1) ampicilina, com  $P < 0,0001$ , risco relativo 5,622 e IC= 1,889 a 16,73; e 2) cloranfenicol com  $P < 0,0001$ , risco

relativo = 9,379 e IC 95% = 3,143 a 27,99. Observou-se também associação significativa entre *S. sonnei* e resistência a azitromicina, com  $P = 0,0100$ , risco relativo = 2,262 e IC 95% = 1,389 a 3,685. Cepas de *S. boydii* e *S. dysenteriae* não foram associadas com nenhum antimicrobiano. Todos os isolados foram sensíveis aos outros antimicrobianos testados (GRÁFICO 5).

**GRÁFICO 5 – Comparação da resistência aos antimicrobianos entre os sorogrupos mais prevalentes de *Shigella* spp.**



AMP = ampicilina, AZT = azitromicina, CEF = cefalotina, CLO = cloranfenicol, SXT = sulfametoxazol-trimetoprima, TET = tetraciclina.

A avaliação quantitativa da resistência, de acordo com quantidade de antimicrobianos aos quais os isolados são resistentes, foi realizada entre os sorogrupos de *Shigella* spp.. Cerca de 70% (44/63) dos isolados foram classificados como resistentes a pelo menos três antimicrobianos, sendo a maioria (55%, 24/44) destes isolados de *S. flexneri*. 58% (11/19) dos isolados resistentes a até dois antimicrobianos eram *S. sonnei* (TABELA 10). O fenótipo de resistência a três ou mais fármacos antimicrobianos foi associado com o sorogrupo *S. flexneri* ( $P = 0,0054$ , risco relativo = 1,600 e IC 95% = 1,160 a 2,206). Os perfis de resistência mais frequentes foram: a) sulfametoxazol/trimetoprima + tetraciclina em isolados resistentes a dois; b) sulfametoxazol/trimetoprima + tetraciclina + ampicilina em isolados resistentes a três; e c) sulfametoxazol/trimetoprima + tetraciclina + ampicilina + cloranfenicol em isolados resistentes a quatro antimicrobianos.

**TABELA 10 – Caracterização quanto ao número de antimicrobianos aos quais os sorogrupos de *Shigella* spp são resistentes.**

Número de antimicrobianos	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Total
0	0	1 (50%)	0	1 (50%)	2 (3%)
1	2 (33%)	2 (33%)	2 (33%)	0	6 (9%)
2	1 (9%)	8 (73%)	0	2 (18%)	11 (17%)
3	3 (25%)	7 (58%)	0	2 (17%)	12 (19%)
4	16 (64%)	8 (32%)	1 (4%)	0	25 (40%)
5	5 (72%)	1 (14%)	1 (14%)	0	7 (11%)
<b>Total</b>	27	27	4	5	63

Dentre os 63 isolados, 68,2% (43/63) apresentaram fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos um fármaco de três classes diferentes de antimicrobianos), sendo 55,8% (24/43) classificados como *S. flexneri*, 37,2 % (16/43) como *S. sonnei*, 4,6 % (2/43) como *S. dysenteriae* e 2,3 % (1/43) como *S. boydii*. Obteve-se associação entre *S. flexneri* e multirresistência, com  $P = 0,0027$ , risco relativo = 1,684 e IC 95% 1,203 a 2,358. Os antimicrobianos mais prevalentes dos perfis de multirresistência foram: sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol e azitromicina.

### **7.9 Análise de associação entre virulência e resistência antimicrobiana nos isolados de *Shigella* spp.**

A avaliação de potencial correlação entre virulência e resistência antimicrobiana mostrou que os genes de virulência *pic*, *set* e *sepA* possuem correlação com a resistência a três ou mais antimicrobianos (TABELA 11). A análise de associação estatística entre presença do gene *pic* e resistência a pelo menos três antimicrobianos diferentes mostrou significância estatística com  $P = 0,0029$ , risco relativo = 1,634, IC 95% = 1,244 a 2,147. Para o gene *set*, a mesma correlação mostrou  $P = 0,0012$ , risco relativo = 1,702, IC 95% = 1,279 a 2,265. Para o gene *sepA*, a mesma correlação mostrou  $P = 0,0081$ , risco relativo = 1,979, IC 95% = 1,047 a 3,741.

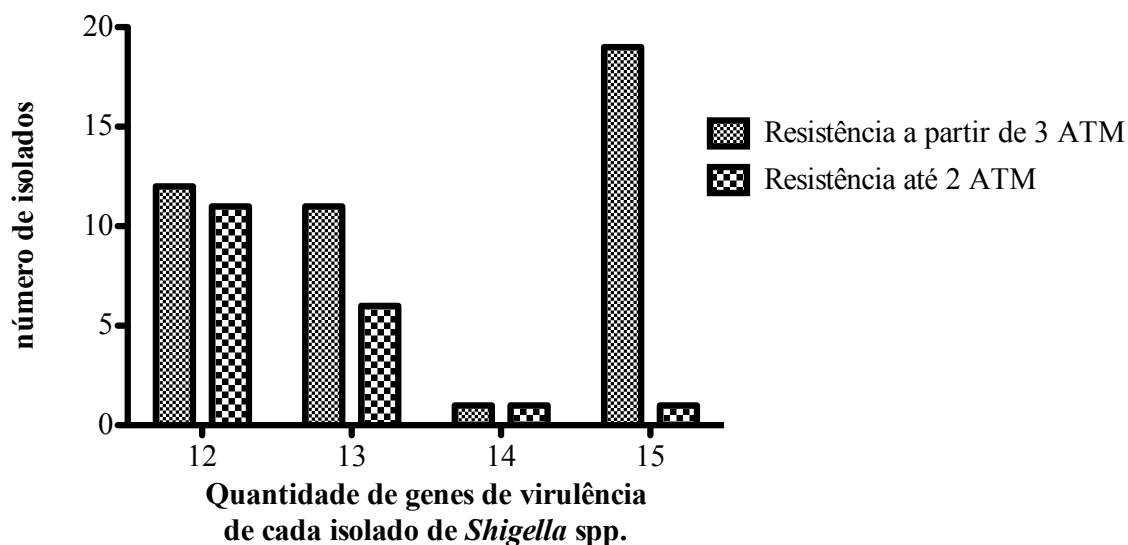
**TABELA 11 - Distribuição da resistência a três ou mais antimicrobianos e a presença dos genes *pic*, *set* e *sepA* entre os isolados de *Shigella* spp.**

	<b>Resistência a dois ou menos quaisquer antimicrobianos</b>	<b>Resistência a três ou mais quaisquer antimicrobianos</b>	<b>Total</b>
<b>Presença do gene <i>pic</i></b>	1 (5%)	19 (95%)	20
<b>Presença do gene <i>set</i></b>	1 (5%)	21 (95%)	22
<b>Presença do gene <i>sepA</i></b>	10 (21%)	38 (79%)	48

Além disso, 5% (1/20) dos isolados de *Shigella* spp. que continham os três genes genes de virulência *pic*, *set* e *sepA* possuíam resistência a dois ou menos quaisquer antimicrobianos, enquanto 57% (25/44) dos isolados de *Shigella* spp. que não continham os três genes possuíam resistência a três ou mais antimicrobianos. A análise de associação entre presença concomitante dos genes de virulência *pic*, *set* e *sepA* e resistência a pelo menos três antimicrobianos diferentes mostrou significância estatística com  $P = 0,0028$ , risco relativo = 0,1158, IC 95% = 0,01663 a 0,8063.

Quando analisada a quantidade de genes de virulência detectados entre os isolados de *Shigella* spp. e sua relação com a resistência antimicrobiana, observou-se uma tendência de maior prevalência de genes de virulência em isolados resistentes a maior quantidade de antimicrobianos (GRÁFICO 6). Observou-se 80% dos genes de virulência analisados com associação estatística entre resistência a pelo menos três antimicrobianos e frequência acima de, com  $P = 0,0233$ , risco relativo = 1,912 e IC 95% = 1,030 a 3,552.

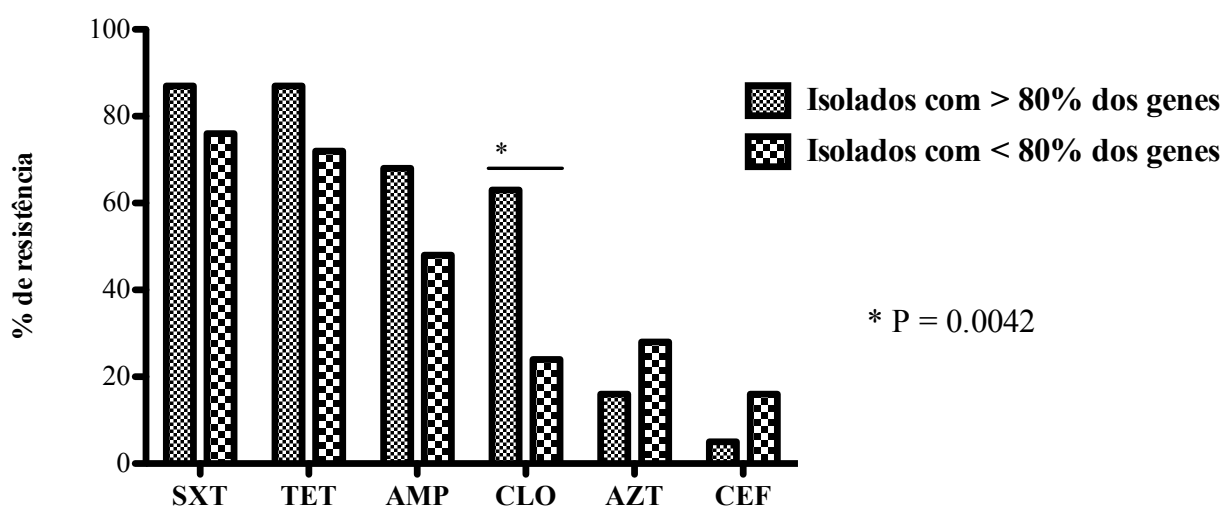
**GRÁFICO 6 – Relação da resistência a mais de dois antimicrobianos e a quantidade de genes de virulência de cada isolado de *Shigella* spp.**



A quantidade de genes de virulência dos isolados de *Shigella* sp. foi associada diretamente com quantidade de antimicrobianos aos quais os isolados são resistentes, mostrando valor de  $r$  de Pearson = 0,4354 e  $P = 0,0004$ .

Quando investigadas associações entre a resistência a antimicrobianos específicos e a maior prevalência de genes de virulência analisados em cada isolado de *Shigella* spp., observou-se variação das diferenças para cada antimicrobiano (GRÁFICO 7), com associação significativa entre resistência a cloranfenicol e prevalência acima de 80% dos genes de virulência analisados, com  $P = 0,0042$ , risco relativo = 1,886 e IC 95% = 1,219 a 2,916.

**GRÁFICO 7 – Distribuição da resistência a antimicrobianos específicos entre os isolados de *Shigella* spp. com prevalência acima ou abaixo de 80% dos genes de virulência analisados.**



AMP = ampicilina, AZT = azitromicina, CEF = cefalotina, CLO = clorafenicol, SXT = sulfametoxazol-trimetoprima, TET = tetraciclina.

Nenhum dos sintomas clínicos investigados foi associado à maior resistência antimicrobiana dos isolados de *Shigella* spp. Entre os isolados resistentes a pelo menos três diferentes antimicrobianos, 53% (23/43) apresentaram sangue nas fezes, 72% (31/43) apresentaram intensa dor abdominal, 70% (30/43) apresentaram vômitos e 95% (41/43) apresentaram febre. Entre os isolados resistentes a até dois diferentes antimicrobianos, 32% (6/19), 68% (13/19), 84% (16/19) e 100% apresentaram sangue nas fezes, intensa dor abdominal, vômitos e febre, respectivamente.

### 7.10 Avaliação clínica e determinantes microbianos de *Shigella*

No formulário de avaliação clínica, analisaram-se as manifestações clínicas além da diarreia (presença de sangue nas fezes, intensas dores abdominais, vômitos e febre) nas crianças a fim de caracterizar o grau de severidade da doença. Além disso, investigou-se a duração da diarreia na criança reportada pelo responsável no momento do atendimento. Das 62 crianças analisadas, 47% (29/62) apresentaram sangue nas fezes, 69% (43/62) reportaram intensa dor abdominal, 74% (46/62) descreveram a ocorrência de vômito e 97% (60/62) reportaram febre.



Quanto à duração da diarreia, a maioria (66%) reportou diarreia até dois dias antes do atendimento (TABELA 12).

**TABELA 12 – Caracterização quanto aos sintomas clínicos das crianças com diarreia diagnosticadas com *Shigella* spp.**

Sintomas clínicos	Sim	Não	Total
Febre	60	2	
Dor abdominal	43	19	
Sangue nas fezes	29	33	
Vômito	46	16	
			62 (100%)
<b>Duração da diarreia</b>			
Até 2 dias	41 (66%)	21	
De 3 a 7 dias	16 (26%)	46	
Acima de 7 dias	5 (8%)	57	
			62 (100%)

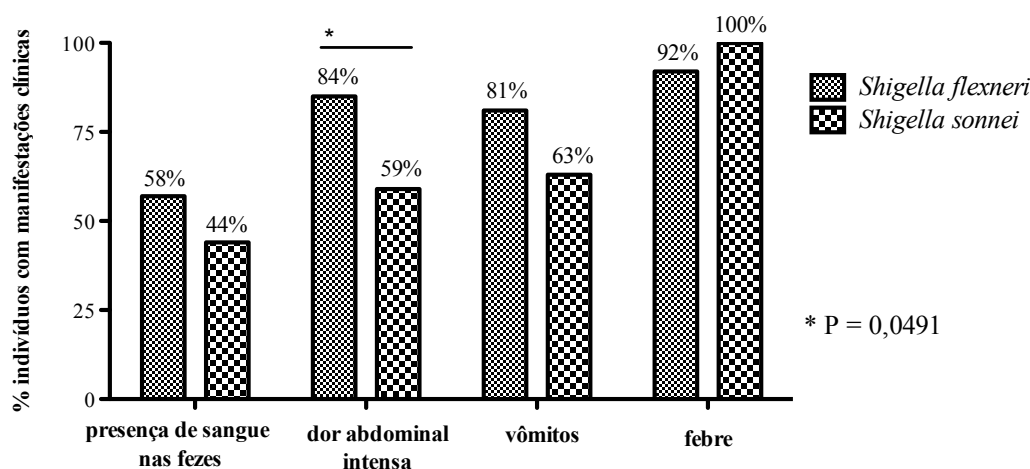
\*Não foi possível obter o dado de uma criança

Quanto à duração da diarreia reportada ao momento do atendimento, das 21 crianças que reportaram diarreia com duração acima de dois dias, 11 (52,38%), 7 (33,33%), 2 (9,52%) e 1 (4,76%) foram diagnosticadas com *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*, respectivamente. Das 41 crianças que reportaram diarreia com duração de até dois dias, 15 (36,58%), 20 (48,78%), 2 (4,87%) e 4 (9,75%) foram diagnosticadas como *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*, respectivamente. Não houve associação com nenhuma das classificações de duração de diarreia e sorogrupos de *Shigella* spp..

Quando analisadas as manifestações clínicas em relação ao sorogrupo de *Shigella* envolvido, percebeu-se uma maior frequência dos sintomas em crianças infectadas pela *S. flexneri*, em relação à *S. sonnei* (GRÁFICO 8). Das 26 crianças infectadas por *S. flexneri*, 15 (58%) apresentaram sangue nas fezes e 21 (81%) referiram vômitos, enquanto das 27 crianças infectadas por *S. sonnei*, 12 (44%) tiveram presença de sangue nas fezes e 17 (63%) referiram vômitos. Apesar de maiores proporções, tais sintomas (presença de sangue nas fezes e vômitos) não tiveram proporções estatisticamente significantes com o sorogrupo *S. flexneri*. Entretanto, o sorogrupo *S. flexneri* mostrou associação com a ocorrência de intensas dores abdominais com

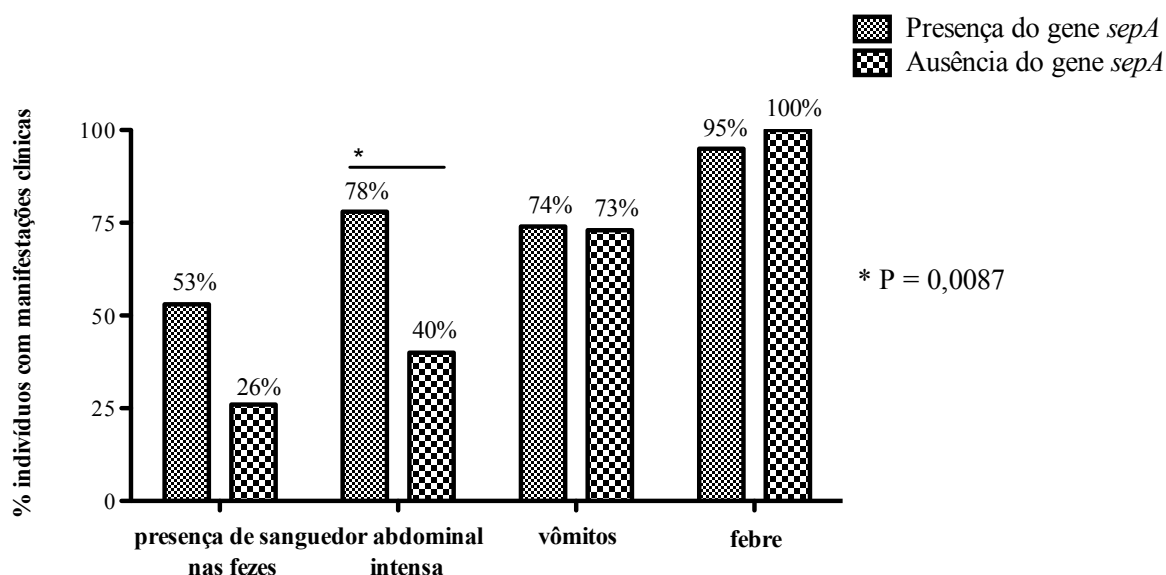
$P = 0,0491$ , risco relativo = 2,435 e IC 95% = 0,9698 a 6,090. Das 26 crianças infectadas por *S. flexneri*, 22 (84%) apresentaram intensas dores abdominais. Não houve associação estatística com nenhum dos outros sintomas clínicos investigados e sorogrupos de *Shigella* spp..

**GRÁFICO 8 - Frequência das manifestações clínicas (presença de sangue nas fezes, dor abdominal intensa, vômito e febre) em crianças infectadas pelos sorogrupos *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei***



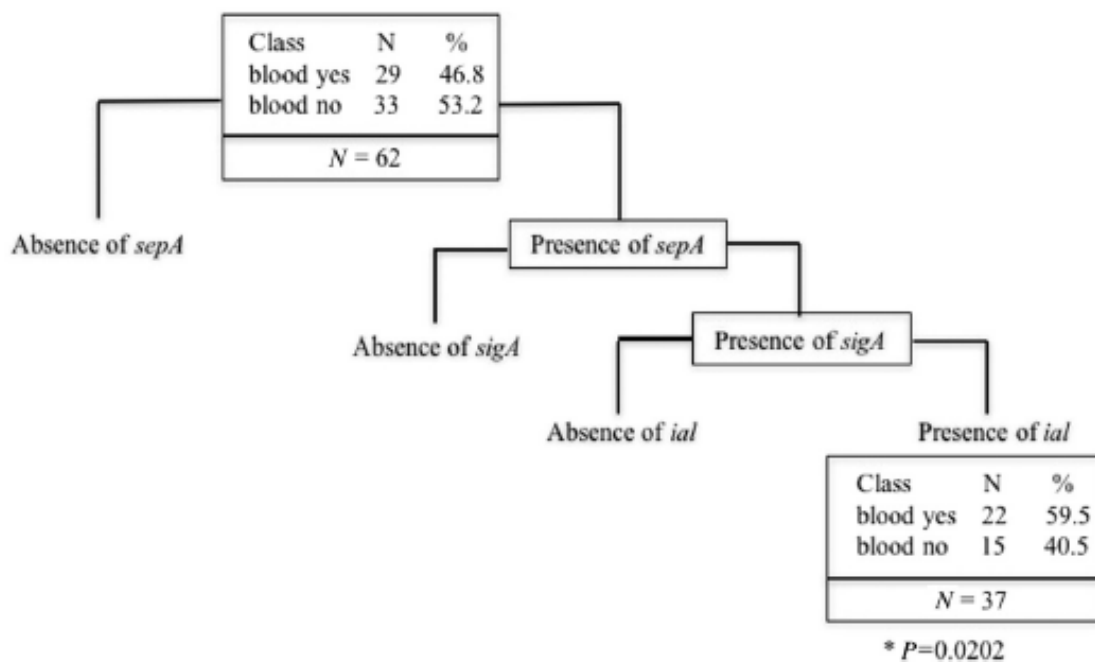
Quando comparadas as frequências das manifestações clínicas com a ocorrência dos genes de virulência estudados, 53% (25/47) dos indivíduos infectados com isolados contendo o gene *sepA* apresentaram sangue nas fezes, enquanto apenas 26% (4/15) dos indivíduos sem este gene tinham a mesma manifestação. 78% (37/47) dos indivíduos infectados com isolados contendo o gene *sepA* referiram intensa dor abdominal, enquanto apenas 40% (6/15) dos indivíduos sem este gene tinham a mesma manifestação. 74% (35/47) dos indivíduos infectados com isolados contendo o gene *sepA* referiram vômitos, enquanto 73% (11/15) dos indivíduos sem este gene tinham a mesma manifestação. 95% (45/47) dos indivíduos infectados com isolados contendo o gene *sepA* referiram febre, enquanto 100% (15/15) dos indivíduos sem este gene tinham a mesma manifestação. A presença do gene *sepA* foi associada à presença de intensas dores abdominais ( $P = 0,0087$ , risco relativo = 1,635 IC 95% = 1,049 a 2,547). Tais resultados são independentes das espécies de *Shigella* (GRÁFICO 9).

**GRÁFICO 9 - Frequência das manifestações clínicas (presença de sangue nas fezes, dor abdominal intensa, vômito e febre) em crianças infectadas por espécies de *Shigella* spp. que continham ou não o gene *sepA*.**



A análise pelo programa CART das combinações de genes de virulência associadas às manifestações clínicas mostrou uma combinação correlacionada com presença de sangue nas fezes, composta pelos genes *sepA*, *sigA* e *ial* ( $P = 0,0202$  RR = 2,124 IC 95% 1,073 a 4,203) (FIGURA 11). Para esta árvore, o gene *sepA* foi o mais forte preditor para a ocorrência de sangue nas fezes, por aparecer na divisão inicial do nodo de origem. As combinações geradas para associação com o sintoma dores abdominais intensas iniciavam pela presença do gene *sepA*, o qual isoladamente foi associado com esta manifestação clínica. Tais resultados são independentes das espécies de *Shigella*. Além disso, nenhuma combinação de genes foi associada com os sintomas febre e vômitos.

FIGURA 11 – Árvore de decisão construída pelo programa CART (Árvore de Classificação e Regressão) combinando genes de virulência de *Shigella* sp. e presença de sangue nas fezes das crianças analisadas.



## 8. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a virulência e a resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de crianças com diarreia moderada a grave atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin e no Centro de Assistência à Criança Dra Lúcia de Fátima R. G. Sá durante o período de abril de 2008 a maio de 2009 em Fortaleza, Ceará, Brasil.

A diarreia moderada a grave ainda representa um grande problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, e diversos estudos demonstram associação de eventos de diarreia com desenvolvimento físico e cognitivo prejudicados (FISHER et al., 2012; KEUSCH et al., 2013; RICHARD et al., 2013;). A definição de diarreia utilizada no presente estudo - ocorrência de três ou mais fezes líquidas por no mínimo 24 horas anteriores ao atendimento - está em acordo com outros estudos de impacto que avaliaram o problema (BAKER et al., 2014; KOTLOFF et al., 2013).

A importância das espécies de *Shigella* spp. para o impacto da diarreia é consideravelmente significativa e a população infantil é a mais afetada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005; KOTLOFF et al., 2013). A população deste estudo teve a investigação etiológica bacteriana da diarreia avaliada em trabalho já publicado. Os resultados mostraram que *Shigella* sp. foi a causa mais predominante de diarreia no estudo, com 16,4 % (60/366), seguido de *Campylobacter* sp. (6,0%, 22/366), *Escherichia coli* não - O157:H7 (5,7%, 21/366) e *Salmonella* sp. (2,2%, 8/366) (QUETZ et al., 2012).

A natureza epidemiológica transversal do presente estudo limitou a determinação de associações entre algumas variáveis, como entre as diferentes espécies de *Shigella* spp. e a ocorrência de diarreia. Não foi possível também estabelecer relações causais entre os parâmetros e fenômenos aqui avaliados. Desenhos experimentais caso-controle e coorte poderiam responder tais questionamentos. (LEVIN et al., 2006). Contudo, estudos transversais têm a capacidade de caracterizar um fenômeno em determinado tempo e espaço, levantando rapidamente hipóteses pertinentes a serem avaliadas em modelos mais complexos posteriormente (AVACHAT et al., 2011).

Os isolados de *Shigella* spp deste estudo foram previamente identificados por meios de cultura tradicionais e provas bioquímicas (QUETZ et al., 2012). O uso da microbiologia convencional para identificação de *Shigella* spp. é ainda considerado o padrão-ouro para o diagnóstico microbiológico e o mais comumente empregado nos laboratórios clínicos de rotina (KONEMAN et al., 2008). Entretanto, vários estudos nos últimos anos têm mostrado as

vantagens da biologia molecular, principalmente em sensibilidade, especificidade e rapidez de resultados (LINDSAY et al., 2015; MOKHTARI et al., 2012; THIEM et al., 2001). Em estudo multicêntrico realizado na Ásia, os autores apontaram que o DNA de *Shigella* pôde ser detectado em até um terço de amostras com diagnóstico microbiológico convencional negativo (SEIDLEN et al., 2006). Dessa forma, o número amostral de isolados de *Shigella* spp. deste estudo não representa a estimativa real. Todavia, é preciso destacar ainda as limitações sobre o diagnóstico molecular de shigelose. Ainda não há consenso sobre uma abordagem molecular que possa diferenciar de forma segura *Escherichia coli* enteroinvasiva e *Shigella* spp. (LIMA et al., 2015). A maioria dos estudos de diagnóstico molecular de shigelose utilizam como alvo o gene *ipaH*, gene presente nos dois patógenos que codifica componente do complexo de invasão celular (LI et al., 2009; LIMA et al., 2016; MOKHTARI et al., 2012; OJHA et al., 2013; RANJBAR et al., 2014; THIEM et al., 2001; ZHAO et al., 2013).

A investigação da ocorrência de coinfeções é de extrema importância no estudo das infecções entéricas, principalmente em países em desenvolvimento, onde existe constante exposição a diversos patógenos do ambiente (GUERRANT et al., 2013). Neste estudo, a investigação da etiologia bacteriana identificou apenas duas amostras com outros patógenos, além de *Shigella* sp, equivalente a 3% (2/63), sendo um com coinfeção por *Campylobacter* sp e outra com *Escherichia coli* não - O157:H7. Dessa forma, a partir das ferramentas de análise utilizadas, não se observou contribuição considerável de coinfeções nesta população.

A distribuição de sorogrupos de *Shigella* spp. neste estudo mostrou altas e iguais proporções de *S. flexneri* e *S. sonnei*, enquanto *S. boydii* e *S. dysenteriae* mostraram-se consideravelmente inferiores. No mundo, a presença de *S. flexneri* é maior em países em desenvolvimento, enquanto *S. sonnei* é mais predominante em países desenvolvidos (NYOGI et al., 2005). As hipóteses que explicam tal fenômeno foram recentemente revisadas, indicando que a proteção por imunidade adquirida em indivíduos de países em desenvolvimento contra *S. sonnei* pode desempenhar importante papel. Além disso, a proteção de *S. sonnei* em amebas confere vantagem para sobrevivência deste sorogrupo frente ao tratamento químico em águas de países desenvolvidos (THOMPSON et al., 2015).

No Brasil, devido à vasta extensão territorial e suas profundas diferenças socioeconômicas entre as regiões, a distribuição de sorogrupos de *Shigella* spp. varia. Enquanto em Minas Gerais e em São Paulo, há alta prevalência de *S. sonnei* (PENNATI et al., 2007; SOUSA et al., 2013), no Amazonas, Piauí e Rondônia, há predomínio de *S. flexneri* (DA CRUZ et al., 2014; NUNES et al., 2012; SILVA et al., 2008).

Neste contexto, proporções similares de *S. sonnei* e *S. flexneri* na população de estudo apontam para uma provável fase de transição socioeconômica de Fortaleza, tendo em vista que estudos anteriores na mesma cidade haviam detectado uma maior prevalência (70%) de *S. flexneri* (LIMA, 1995). Na China, o progresso socioeconômico de industrialização nos últimos dez anos já foi associado a uma mudança de distribuição de sorogrupos de *Shigella* spp., com redução de *S. flexneri* e ascensão de *S. sonnei* (QIU et al., 2015). Ram e colaboradores (2008) mostraram esta tendência econômica após análise de 56 estudos e associação do produto interno bruto (PIB) e proporção de *S. sonnei*. Em Fortaleza, postulamos que o progresso socioeconômico, reflexo da mudança no padrão de sorogrupos de *Shigella* spp., pode estar relacionado a melhorias em saneamento básico, tratamento de alimentos, águas e cuidados higiênicos, corroborando com as hipóteses biológicas apresentadas para a distribuição de *S. sonnei* e *S. flexneri* em diferentes países (THOMPSON et al. 2015).

A detecção de *S. dysenteriae* na população de estudo, apesar de baixa, deve alertar para possíveis disseminação deste sorogrupo no ambiente, sendo objeto de preocupação de saúde pública. A maioria dos óbitos associados à shigelose são causados por *Shigella dysenteriae*. Entretanto, entre as cepas de *S. dysenteriae*, o sorotipo 1 é tido como o principal agente causador da forma mais grave de shigelose, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Neste estudo, todos os cinco isolados de *S. dysenteriae* foram classificados como sorotipo 2. A baixa prevalência de *S. boydii* verificada neste estudo também está em acordo com estudos prévios. Este sorogrupo é mais comumente restrito a Bangladesh e Sudeste Asiático (ANDERSON et al., 2016; LIMA et al., 2015).

A caracterização clínica da shigelose é descrita como uma inflamação intestinal aguda resultando em fortes dores abdominais, febre, vômitos e diarreia sanguinolenta (SANSONETI et al., 2006). Corroborando com a literatura, neste estudo, observou-se uma alta prevalência dos sintomas febre, dor abdominal, vômito e sangue nas fezes nas crianças. A maioria dos casos foi de crianças que procuraram o atendimento após dois dias de diarreia, evidenciando a natureza aguda e a severidade clínica características da shigelose (MAURELLI et al., 2013). Entre os sorogrupos, *S. flexneri* foi associado com intensas dores abdominais. Classicamente, a infecção por *S. dysenteriae* é associada como a forma mais grave e a infecção por *S. flexneri* é, em geral, mais grave do que a infecção por *S. sonnei* (NIYOGI et al., 2005). Devido ao reduzido número de amostras diagnosticadas como *S. boydii* e *S. dysenteriae*, não foi possível uma análise mais precisa da ocorrência de sintomas nestes quadros.

O uso de escores clínicos para a caracterização da severidade das doenças diarreicas é objeto de estudo de vários trabalhos, sendo preditores de relevantes desfechos da saúde infantil (LEE et al., 2016). Recentemente, um modelo de avaliação da severidade de diarreia da comunidade incluiu durações do período febril, anorexia, vômito e fezes líquidas, além de número de fezes por dia (LEE et al., 2014). No presente estudo, não foi utilizado nenhum modelo de escores clínicos de diarreia. A aplicação de questionários de investigação clínica em consonância com modelos de escores clínicos para diarreia da literatura ajudaria na melhor otimização e comparação dos dados deste trabalho. Contudo, as manifestações clínicas aqui investigadas estão em consonância com o preconizado pelo último consenso internacional para o algoritmo de manejo da diarreia infantil, com exceção da ausência de análise de desidratação (VECCHIO et al., 2016).

A situação socioeconômica das crianças do estudo foi caracterizada somente quanto à renda mensal familiar. Outros parâmetros, como tipo de moradia, nível de escolaridade e condições de saneamento básico são utilizados por outros estudos. O baixo valor médio encontrado da renda mensal e os endereços residenciais das famílias indicam uma predominância de baixo nível socioeconômico da população do estudo. A associação de infecções entéricas com pobreza está consolidada na literatura (BHUTTA et al., 2014). Neste estudo, a renda mensal familiar abaixo do salário mínimo foi associada à infecção por *S. flexneri*, enquanto a renda mensal familiar acima do salário mínimo foi associada com *S. sonnei*. Embora não haja na literatura dados de renda mensal comparados à detecção de sorogrupos de *Shigella* em um mesmo local, tal achado corrobora com os indicativos de que *Shigella sonnei* é mais frequente em áreas mais desenvolvidas e *Shigella flexneri* em áreas menos desenvolvidas (NYOGI et al., 2005). Este resultado sugere que, mesmo dentro de uma mesma região, podem haver diferentes nichos de *Shigella* spp. Não obstante, é importante notar que a população deste estudo foi provavelmente composta por crianças predominantemente de nível socioeconômico baixo, devido às características dos postos de atendimento médico analisados. Além disso, a baixa renda mensal familiar média e o fato de não existirem crianças de bairros com IDH alto reforçam tal observação neste estudo. Dessa forma, a partir de tal viés, é preciso considerar que os dados aqui relatados são característicos de shigelose em crianças de baixa renda de Fortaleza.

A distribuição geográfica de *Shigella* spp. é investigada em diversos estudos, principalmente com o objetivo de identificar fatores de risco e mecanismos de transmissão específicos entre as espécies para o ciclo da shigelose (EMCH et al., 2008; KIM et al., 2008; TANG et al., 2014). Emch e colaboradores (2008) identificaram diferentes perfis de localização



para *S. flexneri* e *S. dysenteriae* em Bangladesh, sugerindo diferentes modos de transmissão. No presente estudo, os dados sugerem que cepas de *S. flexneri* se distribuem de forma diferente em relação a cepas de *S. sonnei* em Fortaleza, Ceará. Embora a associação de *S. sonnei* com países desenvolvidos e *S. flexneri* com países em desenvolvimento já tenha sido largamente demonstrada, o presente estudo indica, a partir da associação de *S. flexneri* com crianças com baixa renda mensal familiar em relação às crianças infectadas por *S. sonnei*, e da análise dos endereços residenciais destas famílias, que esta diferenciação pode acontecer dentro de uma mesma cidade.

Neste estudo, a maior severidade da shigelose foi associada com *S. flexneri*. Além disso, este mesmo sorogrupo foi associado à menor renda mensal familiar e potencialmente à diferente localização geográfica. O conjunto destes dados sugerem um mecanismo adaptativo específico da *S. flexneri* em relação a *S. sonnei* com potencial associação entre colonização ambiental e virulência em Fortaleza, Ceará, Brasil. Os mecanismos adaptativos específicos de cada espécie de *Shigella* spp. devem ser melhor investigados, como sugerido em recente revisão sobre o tema (ANDERSON et al., 2016).

Vários estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção de genes de virulência de isolados de *Shigella* spp., sendo principalmente reações de PCR (CASABONNE et al., 2016; DA CRUZ et al., 2014; FARSHAD et al., 2006; GHOSH et al., 2014; NAVE et al., 2016). Neste contexto, é preciso compreender a real significância dos estudos de detecção de genes de virulência para o entendimento da patogênese de microorganismos. Edberg (2009) questiona: a presença de genes de virulência significa que estes genes serão ativos? Devido aos variados processos de regulação da expressão gênica existentes, por meio de fatores ambientais, a simples presença de um gene não significa que este será expresso em proteínas e exercerá sua função. Dessa forma, o impacto clínico destas análises deve ser sempre ponderado (EDBERG et al., 2009).

As metodologias de detecção de genes de virulência em amostras clínicas de shigelose envolvem a escolha de genes reconhecidamente relacionados a uma maior virulência do microorganismo e/ou severidade da doença. O presente estudo destaca-se pelo ineditismo no desenvolvimento de metodologia composta por quatro PCR múltiplas capaz de detectar até 16 genes de *Shigella*. Na literatura, a vasta maioria dos estudos de *Shigella* avalia apenas, em média, cinco genes de virulência (FARSHAD et al., 2006; GHOSH et al., 2014; LLUQUE et al., 2015; SANGETA et al., 2014; SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2013). Dois estudos mais recentes desenvolveram painel com 11 e 12 genes (CASABONNE et al., 2016; NAVE et al.,

2015). Embora reconheça-se as limitações de estudos de detecção de genes de virulência frente a investigações genômicas mais modernas (THE et al., 2016), o foco no desenvolvimento de protocolos de detecção de genes de virulência pode ser de extrema utilidade para microbiologistas e médicos, podendo ajudar no entendimento da patogênese e monitoramento clínico-epidemiológico de maneira mais simples.

Neste estudo, observou-se uma alta prevalência dos genes de virulência dos isolados de *Shigella* spp. Entre os sorogrupos, *S. flexneri* foi associada a maior quantidade de genes de virulência detectados, corroborando com estudo realizado em crianças do Peru (LLUQUE et al., 2015). Ademais, este dado corrobora com os resultados da avaliação clínica na população deste estudo, onde *S. flexneri* foi associada à maior severidade (elevada frequência de intensa dor abdominal). O sorogrupo *S. boydii* apresentou menor média de genes de virulência detectados. Embora o número amostral deste sorogrupo seja pequeno, *S. boydii* é descrita como o sorogrupo menos virulento, sendo responsável pela menor parcela dos casos de diarreia causados por *Shigella* spp. (KANIA et al., 2016).

Diversos estudos têm investigado genes de virulência de *Shigella* spp. proveniente de amostras clínicas de diferentes locais do mundo, como Argentina (CASABONNE et al., 2016), Costa do Marfim (ANTOINE et al., 2010), Índia (GHOSH et al., 2014; ROY et al., 2006; SANGEETHA et al., 2014), Irã (FARSHAD et al., 2006; NAVE et al., 2016), Malásia (THONG et al., 2005) e Peru (LLUQUE et al., 2015). A maioria destes estudos focou mais na detecção dos genes codificadores das enterotoxinas de *Shigella*, gene *set* (enterotoxina 1 de *Shigella* – ShET1) e gene *sen* (enterotoxina 2 de *Shigella* – ShET2), além dos genes *ipaH* e *ial*, envolvidos na expressão de proteínas componentes do complexo de invasão celular. A associação da presença de genes de virulência específicos com desfechos clínicos da doença ou fatores epidemiológicos não foi encontrada em nenhum destes estudos, mesmo naqueles que englobaram a análise mais diversa de genes de virulência, de Nave (2016) e Casabonne (2016).

No Brasil, apenas três estudos já investigaram genes de virulência em isolados de *Shigella* spp., um na região Sudeste, estado de Minas Gerais (SOUZA et al., 2013), e os outros dois na região Amazônica, 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, deixa ainda grandes lacunas no entendimento da virulência de *Shigella* spp. no Brasil. Além disso, a ausência de estudos de virulência no Nordeste Brasileiro, região menos desenvolvida economicamente do país, reforça a importância do conhecimento gerado pelo presente estudo.

No estudo de Cruz e colaboradores (2014), realizado com crianças com diarreia da cidade de Manaus, Brasil, houve associação da presença de genes de *Shigella* sp. com sintomatologia clínica, sendo o gene *set* relacionado à desidratação e o gene *sen* com presença de sangue nas fezes. Neste sentido, os dados deste trabalho reforçam o envolvimento do gene *set* para a maior severidade da shigelose, a partir da associação da presença concomitante de *set*, *pic* e *sepA* com intensas dores abdominais.

Neste estudo, o gene *ipaH*, principal alvo de identificação de *Shigella* sp. empregado em estudos moleculares (KINGOMBE, 2005), foi detectado em todas as amostras, corroborando com os dados de várias análises (LLUQUE et al., 2015; FARSHAD et al., 2006; GHOSH et al., 2014; NAVE et al., 2016; SANGHETA et al., 2014; SOUSA et al., 2013; THONG et al., 2005). Alguns trabalhos exibem uma taxa de detecção acima de 90% deste gene para isolados de *Shigella* sp. (ANTONIE et al., 2010; CASABONNE et al., 2016).

A alta prevalência de diversos genes analisados neste trabalho corrobora com achados de outros estudos que realizaram diagnóstico destes marcadores em diferentes populações: *ipaA-Cs* (FARSHAD et al., 2006; SILVA et al., 2008), *ial* (GHOSH et al., 2014; SANGHETA et al., 2014), *icsA* (LLUQUE et al., 2015), *sen* (AHMED et al., 2006; GHOSH et al., 2014; LLUQUE et al., 2015) e *virF* (GHOSH et al., 2014). Não foi encontrado nenhum estudo que tenha analisado os genes *icsB* e *virB*.

A não detecção do gene da toxina Shiga 1 (*stx*) nos isolados corrobora com os dados obtidos em estudo feito na Índia (SANGHETA et al., 2014). Este gene está associado à *S. dysenteriae* tipo 1. Entretanto, no presente estudo, todos os 5 isolados de *S. dysenteriae* foram classificados como subtipo 2.

A detecção dos genes de virulência *set*, *pic* e *sepA* foi associada à *S. flexneri*, reforçando a importância destes genes para a patogênese de *S. flexneri*. A maior frequência do gene *set* em *S. flexneri* foi relatada em vários estudos (AHMED et al., 2006; LLUQUE et al., 2015; SOUSA et al., 2013). A enterotoxina 1 de *Shigella*, ShET1, codificada pelo gene *set* presente no cromossomo, está envolvida nos efeitos relacionados à indução de secreção intestinal e consequente diarreia aquosa em shigelose (FARFAN et al., 2012). Os estudos de Lluque (2015) e Nave (2016) identificaram o gene *pic* apenas em isolados de *S. flexneri*, corroborando com os achados aqui apresentados. A proteína Pic (*Protein Involved in Colonization*) é uma protease de *Enterobacteriaceae* do grupo das serino-proteases autotransportadoras, tem atividade de mucinase (HARRINGTON et al., 2009), é associada à patogênese de *Escherichia coli* enteroagregativa (BEHRENS et al., 2002) e mais recentemente foi relacionada à inibição da

resposta imune por inativação do sistema complemento (ABREU et al., 2015). Zhang e colaboradores (2013) mostraram que a deleção do gene *pic* em *S. flexneri* leva à redução da capacidade invasiva em células HeLa.

A associação do gene *sepA* com *S. flexneri* no presente estudo também corrobora com os dados de Lluque (2015) e Nave (2016). A proteína SepA também é outra protease do mesmo grupo da Pic, sendo caracterizada na patogênese de *Shigella* com função de invasão celular e indução de inflamação (FAHERTY et al., 2012). A presença do gene *sepA* isoladamente em cepas de *Shigella* spp. foi associada a intensas dores abdominais na população do estudo. Corroborando com a importância deste gene para a patogênese em shigelose, a análise de classificação e regressão baseada em árvores de decisão por meio do programa CART mostrou que o gene *sepA* também estava presente na combinação de genes de virulência associada com a presença de sangue nas fezes, junto com os genes *sigA* e *ial*. Esta combinação apresenta o gene *sepA* como principal preditor para o desfecho analisado (presença de sangue nas fezes), pois esteve presente no primeiro nó da árvore de decisão (GUPTA et al., 2016). Tal observação também reforça a ideia de que, entre os fatores de virulência analisados do estudo, a proteína SepA contribui de forma destacada para a patogênese da shigelose em Fortaleza, Ceará. Em outro trabalho de combinações de genes de virulência associados à diarreia infantil, sendo com *Escherichia coli* enteroagregativa - EAEC, o gene *sepA* foi também o maior preditor de diarreia (BOISEN et al., 2012). Além disso, SepA estava presente no genoma da *E. coli* produtora de toxina Shiga, responsável por surto de síndrome hemolítica urêmica com várias mortes na Europa em 2011 (FRANK et al., 2011).

O presente estudo avaliou também o fenótipo de resistência dos isolados a vários antimicrobianos. A resistência antimicrobiana em isolados de *Shigella* sp. vem sendo amplamente descrita e é apontada como uma das mais importantes preocupações para o controle da shigelose atualmente (ANDERSON et al., 2016; THOMPSON et al., 2015).

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) pelo método de difusão em disco, de acordo com instruções do CLSI, é largamente utilizado por vários estudos da área (SANGETA et al., 2014; SOUSA et al., 2013). Neste trabalho, o TSA foi empregado, utilizando discos de antimicrobianos escolhidos de acordo com a prática clínica, literatura científica e as recomendações da OMS, ESPGHAN e Ministério da Saúde Brasileiro.

Em relação aos resultados do referido método, o presente estudo mostrou que os isolados de *Shigella* spp. analisados tiveram maior taxa de resistência à sulfametoxazol-trimetoprima, seguida de tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol. Tais achados reforçam a

importância da vigilância da resistência antimicrobiana para o melhor direcionamento da escolha terapêutica (SHIFERAW et al., 2012).

As altas taxas de resistência à combinação sulfametoxazol-trimetoprim e à ampicilina já foram observada em isolados de *Shigella* spp. de locais do Brasil e do mundo (PEIRANO et al., 2006; PONS et al., 2013; QU et al., 2014; SOUSA et al., 2013; TARIQ et al., 2012), inclusive em Fortaleza, Ceará (LIMA et al., 1995). Esses dados confirmam a provável baixa eficácia do uso desses fármacos na shigelose apesar de nos países em desenvolvimento, a ampicilina e o sulfametoxazol-trimetoprim serem largamente usados para tratar a shigelose devido ao baixo custo e a viabilidade destes fármacos (NGUYEN et al., 2005). No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde recomenda o emprego de sulfametoxazol-trimetoprim como primeira escolha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A taxa de resistência ao cloranfenicol relatada no presente estudo corrobora com estudos realizados no Brasil (LIMA et al., 1995; PEIRANO et al., 2006), Índia (GHOSH et al., 2014) e Peru (LLUQUE et al., 2015).

A detecção de resistência à azitromicina entre os isolados de *Shigella* spp. serve de alerta para o uso deste medicamento na população. A azitromicina é um antibiótico com excelente permeabilidade celular que é preconizado pela ESPGHAN como fármaco de primeira escolha para o tratamento da shigelose e é recomendado pela OMS para os casos de *Shigella* spp. resistentes a ciprofloxacina. Outros locais do mundo já vêm registrando taxas semelhantes de resistência a esse antimicrobiano, como no Canadá (GAUDREAU et al., 2014), Espanha (PONS et al., 2013) e Índia (GOSH et al., 2011). No Brasil, nenhum estudo havia reportado a resistência a azitromicina em isolados de *Shigella* sp..

A baixa taxa de resistência à cefalotina entre os isolados de *Shigella* sp. do estudo corrobora com outros estudos com amostras diarreicas de pacientes hospitalizados feito por Farshad (2006) no Irã. Estudos de Pennati. (2007) e Peirano (2006), que relatam dados da região Sudeste do Brasil, identificaram isolados de *Shigella* spp com baixa taxa de resistência a esta cefalosporina de primeira geração. A alta taxa de resistência a esse fármaco foi observada em um estudo caso-controle com amostras de crianças feito por Asrat (2008) na Etiópia. Segundo a ANVISA (2007), a cefalotina tem limitada eficácia terapêutica contra bacilos gram-negativos, enquanto a cefalosporina de terceira geração tem maior eficácia. No presente estudo, cefuroxima, cefalosporina de 2<sup>a</sup> geração, e ceftriaxona, cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração, apresentaram eficácia de 100% frente aos isolados.

As sensibilidades detectadas aos antimicrobianos amicacina e gentamicina estão de acordo com as baixas taxas de resistência encontradas em diversos outros estudos (FARSHAD et al., 2006; DE PAULA et al., 2010; GOSH et al., 2011; SHIFERAW et al., 2012).

Os isolados de *Shigella* spp. do estudo foram todos sensíveis aos antimicrobianos das classes das quinolonas: ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Esses resultados foram igualmente observados por estudo em Fortaleza, no Pará e no Piauí, além de estudos nos países Moçambique e Peru (LIMA et al., 1995; BASTOS et al., 2011; NUNES et al., 2012; MANDOMANDO et al., 2009; BACA et al., 2014). Entretanto, percebe-se uma emergente resistência a quinolonas em algumas regiões do mundo, como observado em estudos realizados na Índia, na Espanha e na China (GOSH et al., 2011; TARIQ et al., 2012; GOSH et al., 2014; PONS et al., 2013; QU et al., 2014). As fluoroquinolonas são uma das classes de antimicrobianos mais usados clinicamente, sendo a ciprofloxacina recomendada pela OMS como primeira linha de tratamento, porém usada com cautela em crianças devido à possibilidade das fluoroquinolonas induzirem toxicidade à cartilagem ou às articulações (NIYOGI, 2007). Os resultados do presente estudo sugerem a possibilidade de eficácia terapêutica com o uso das fluoroquinolonas em shigelose atualmente.

As espécies mais prevalentes de *Shigella* spp. do estudo, *S. flexneri* e *S. sonnei*, tiveram distribuições diferentes quanto à resistência a determinados antimicrobianos testados. Observou-se associação de *S. flexneri* com ampicilina e cloranfenicol, enquanto *S. sonnei* foi associado com azitromicina. A associação de *S. flexneri* com resistência à ampicilina corrobora com outros estudos no Brasil, na Hungria, na Espanha e na China (PENNATI et al., 2007; NOGRADY et al., 2013; PONS et al., 2013; ZHU et al., 2013), embora estudo no Irã tenha encontrado taxas de resistência similar a ampicilina entre *S. flexneri* e *S. sonnei* (JAFIFI et al., 2009). A associação de *S. flexneri* com resistência ao cloranfenicol corrobora com achados de outros estudos (NAVIA et al., 2005; PEIRANO et al., 2006; PENATTI et al., 2007). A associação de *S. sonnei* com azitromicina também já foi relatada (BOURTCHAI et al., 2008).

A resistência a vários antimicrobianos simultaneamente foi detectada, onde a grande maioria dos isolados foi resistente a pelo menos três antimicrobianos. A presença do fenótipo de multirresistência, definida como cepas resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais classes simultaneamente (ANVISA, 2015), foi observada com alta frequência neste estudo (69,8 %). Altas taxas de multirresistência de isolados de *Shigella* spp. a vários antimicrobianos simultaneamente já foram relatadas em diversos estudos (PONS et al., 2013; QU et al., 2014; ZHU et al., 2013).

O sorogrupo *S. flexneri* foi associado à resistência a maior quantidade de antimicrobianos em relação às outras espécies. Na literatura, a maioria dos estudos corrobora com tal achado (TARIQ et al., 2012; BASTOS et al., 2011; DE PAULA et al., 2010; MADIYAROV et al., 2010; QU et al., 2014; SHEN et al., 2013; GOSH et al., 2011; SHIFERAW et al., 2012; ZHU et al., 2013; PONS et al., 2013). Contudo, em outros locais, as mais altas taxas de resistência foram identificadas para *S. sonnei* (JAFARI et al., 2009; FARSHAD et al., 2006; SHEN et al., 2013; NOGRADY et al., 2013). É sabido que a resistência antimicrobiana pode variar entre diferentes localidades (SHIFERAW et al., 2012).

Durante a análise dos achados do TSA, a interpretação dos resultados classificados como “Intermediário” sendo utilizados como “Resistente” merece importante reflexão. A sensibilidade de uma cepa bacteriana a um dado antimicrobiano é considerada “Intermediária” quando ela é inibida *in vitro* por uma concentração do fármaco que está associada a um efeito terapêutico incerto. Entretanto, a efetividade de um antimicrobiano pode variar para diferentes sítios de ação. Neste contexto, considera-se que cepas com suscetibilidade intermediária sejam tratadas com doses superiores do fármaco (RODLOFF et al., 2008). Outros estudos que investigaram resistência antimicrobiana em shigelose utilizam a mesma interpretação aqui empregada (KUO et al., 2008; POURAKBARI et al., 2010; PUTNAM et al., 2004; TANEJA et al., 2012). No presente estudo, a grande maioria dos resultados “Intermediário” foi em análises com cepas avaliadas contra azitromicina. Esta observação corrobora com o fato de cepas de *Shigella* spp. não serem resistentes a este fármaco em outros estudos realizados no Brasil.

O conjunto de dados deste estudo reforça a não indicação da combinação sulfametoxazol-trimetoprim para o tratamento de shigelose na população infantil, além de alertar para a emergente resistência a azitromicina na população. É importante destacar que os antimicrobianos com maiores taxas de resistência deste estudo (sulfametoxazol-trimetoprima, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol) são os mesmos de estudo realizado em Fortaleza em 1995 (LIMA et al., 1995). Para uma proposta de indicação terapêutica para shigelose em Fortaleza, considerando a tendência de crescimento da prevalência de *S. sonnei* mundialmente, o estudo sugere a realização de teste de sensibilidade antes do uso de azitromicina. Além disso, sugere a eficácia do uso de ciprofloxacina, com o devido cuidado na dosagem terapêutica em tratamento de crianças, além do uso de ceftriaxona, com administração por via parenteral, necessariamente.

A rápida emergência da resistência antimicrobiana em shigelose deve-se principalmente à grande importância de elementos móveis bacterianos para estes mecanismos (THE et al., 2016). Plasmídeos, transposons e integrons são citados como as principais fontes de resistência em *Shigella* (ZHU et al., 2011). Vários estudos em diferentes locais do mundo têm investigado tais mecanismos (AHMED et al., 2006; ZHU et al., 2013). Em Fortaleza, Lima e colaboradores já demonstraram a existência de diferentes plasmídeos codificadores de resistência a ampicilina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetoprima (LIMA et al., 1997).

A associação entre virulência e resistência antimicrobiana tem sido tema de bastante interesse na comunidade científica microbiológica. Resistência antimicrobiana e virulência bacterianas compartilham características comuns: 1) ambos os processos são, do ponto de vista biológico, necessários para a sobrevivência da bactéria em condições adversas; 2) fatores de virulência e resistência são transmitidos de forma similar entre espécies e gêneros por transferência gênica horizontal; 3) resistência antimicrobiana é frequentemente associada a infecções e, dessa forma, relacionada à virulência, como em casos de biofilmes; e 4) vários mecanismos celulares, como bombas de efluxo, porinas, e alterações na parede celular, envolvem a ativação ou repressão de vários genes relacionados à resistência e virulência (BECEIRO et al., 2013).

Neste estudo, a detecção simultânea de maior número de genes de virulência foi associada com a resistência a maior quantidade de antimicrobianos. Além disso, a presença isolada de cada um dos genes de virulência *set*, *pic* e *sepA* foi associada à resistência a três ou mais antimicrobianos analisados. Juntos, esses achados sugerem uma relação entre virulência e resistência antimicrobiana em isolados de *S. flexneri* na população. Mecanismos genéticos de compensação foram descritos em *S. flexneri* resistentes a quinolonas, potencialmente aumentando a virulência da bactéria (MCNAIR et al., 1995). Contudo, não foram encontrados estudos que confirmem esta associação em isolados de *Shigella* sp.

Este estudo mostra ainda a associação entre virulência e resistência ao cloranfenicol nestes isolados. A resistência ao cloranfenicol se deve a mecanismos de alteração da permeabilidade da membrana celular, mutação na subunidade ribossomal 50S e produção de cloranfenicol-acetiltransferase, codificada pelo gene *cat* (SCHWARZ et al., 2004). A presença concomitante de genes codificadores de resistência ao cloranfenicol e de outros genes codificadores de fatores de virulência já foi descrita em plasmídeos isolados de *E. coli* (WOODFORD et al., 2009). Mais estudos são necessários para melhor descrever este fenômeno em espécies de *Shigella* sp..



As análises de teste de sensibilidade a antimicrobianos vêm sendo cada vez mais acompanhadas de investigações gênicas de mecanismos de resistência associados aos fenótipos encontrados (AHMED et al., 2006; CHANG et al., 2011; TARIQ et al., 2012). Tal abordagem possibilita o entendimento da evolução da resistência em diferentes localidades, além de potencialmente servir de diagnóstico mais rápido de resistência para o tratamento da doença (SUNDSFJORD et al., 2004). Poucos são os trabalhos que avaliam a genética da resistência antimicrobiana em *Shigella* no Brasil (PEIRANO et al., 2005; YU et al., 2010), sendo imperativa a realização de mais estudos para caracterização mais completa. Nesta perspectiva, as amostras deste estudo serão ainda analisadas quanto à presença de genes codificadores de proteínas associadas a mecanismos de resistência em futuros trabalhos.

A realização da coleta das amostras deste estudo ocorreu a mais de cinco anos em relação à presente data de escrita deste trabalho. Tal observação invalida a ideia destes dados como atualização da virulência e resistência antimicrobiana da shigelose em Fortaleza, Ceará, Brasil. Contudo, este estudo serve para indicar mudanças já ocorridas e como registro da situação epidemiológica da shigelose em Fortaleza no período de estudo. Além disso, os achados de associação entre manifestações clínicas, virulência, resistência antimicrobiana aqui relatados contribuem substancialmente para um melhor entendimento de shigelose.

As limitações deste estudo poderiam ser superadas. O uso de técnicas moleculares para o diagnóstico de *Shigella* spp. poderia aumentar o número amostral e dar mais força aos resultados encontrados. A aplicação de questionários de investigação clínica em consonância com modelos de escores clínicos da literatura para diarreia ajudaria na melhor otimização e comparação dos dados do estudo. A investigação genômica dos isolados de *Shigella* spp. permitiria uma avaliação mais completa da genética relacionada à patogênese. Ademais, a determinação de fatores de virulência por técnicas de transcriptômica e proteômica podem elucidar quais genes têm suas funções preservadas. Finalmente, a realização de estudos epidemiológicos de caso-controle ou coorte reforçariam as associações identificadas no presente estudo.

Finalmente, para uma melhor compreensão das mensagens resultantes deste trabalho, os resultados aqui descritos e discutidos podem ser sugeridos, didaticamente, e resumidos nos tópicos a seguir:

- 1- Novas proporções dos sorogrupos de *Shigella* para a população de Fortaleza, com um aumento na frequência de *S. sonnei*, sendo *S. flexneri* ainda prevalente, o que reflete uma provável transição socioeconômica na população;

- 2- Maior frequência de *S. flexneri* entre crianças com renda mensal familiar abaixo de um salário mínimo, enquanto *S. sonnei* teve maior frequência entre crianças com renda mensal familiar acima de um salário mínimo;
- 3- Possível diferenciação da localização geográfica entre espécies de *Shigella* e associação entre distribuição pluviométrica e incidência da shigelose no período de estudo;
- 4- Desenvolvimento de uma nova metodologia para o diagnóstico de 16 genes de virulência de *Shigella*, caracterizada por quatro PCR múltiplos desenvolvidos que podem ser utilizados para futuros estudos de shigelose, caracterizando a virulência das espécies circulantes;
- 5- A associação de maior quantidade de genes de virulência e dos genes *pic*, *set* e *sepA* com a patogênese de *S. flexneri* circulante em Fortaleza;
- 6- A resistência a maior quantidade de antimicrobianos está relacionada ao sorogrupo *S. flexneri* circulante na população do estudo;
- 7- A resistência antimicrobiana pode ser sorogrupo-específica, sendo resistências a ampicilina e cloranfenicol associadas a *S. flexneri*, enquanto resistência a azitromicina associada a *S. sonnei* circulantes;
- 8- A presença dos genes *pic*, *set* e *sepA* está também associada à maior taxa de resistência antimicrobiana nos isolados de *Shigella* spp. do estudo;
- 9- A presença de maior quantidade de genes de virulência está associada à resistência a cloranfenicol na população de estudo;
- 10- Maior frequência de intensas dores abdominais está associada ao sorogrupo *S. flexneri* e à presença do gene *sepA*.

## 9. CONCLUSÕES

A shigelose na população infantil de Fortaleza no período de estudo apresentou-se com proporções predominantes e similares de *S. sonnei* e *S. flexneri*, sugerindo uma provável transição socioeconômica na comunidade. *S. flexneri* foi associada ao maior número de genes de virulência e aos genes *pic*, *set* e *sepA*. A resistência a antimicrobianos comumente usados na prática clínica foi verificada, com destaque para a emergente resistência à azitromicina. *S. flexneri* foi associada ao maior número de antimicrobianos aos quais é resistente e à resistência a ampicilina e cloranfenicol, enquanto *S. sonnei* foi associada à resistência a azitromicina. Cepas que possuem mais genes de virulência foram também cepas com maiores taxas de resistência antimicrobiana, sendo a maior quantidade de genes de virulência correlacionada especificamente com resistência a cloranfenicol. A distribuição geográfica parece variar entre as diferentes espécies, observando-se também a influência da sazonalidade na incidência de casos de shigelose. *S. flexneri* foi associada à menor renda mensal familiar da criança. Clinicamente relevante, mais intensas dores abdominais foram associadas a *S. flexneri* e ao gene *sepA*.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU A. G. et al., The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 212, p. 106-115, 2015.

ADAIR L. S. et al., Associations of linear growth and relative weight gain during early life with adult health and human capital in countries of low and middle income: findings from five birth cohort studies. **Lancet**, v. 382, p. 525-534, 2013.

AHMED, A. M. et al. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1685–1691, 2006.

AHMED, S. F. et al. Epidemiology and genetic characterization of *Shigella flexneri* strains isolated from three paediatric populations in Egypt (2000-2004). **Epidemiology Infections**, v. 134, p. 1237–1248, 2006.

ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 45, 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 Sciences Research**, v. 6, n. 6, p. 594–599, 2010.

ASHIDA, H; MIMURO H.; SASAKAWA, C. *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–12, 2015.

ASHIDA, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* IpaH Family Effectors as a Versatile Model for Studying Pathogenic Bacteria. v. 5, n. January, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1-6, 2016.

AVACHAT, S. S. et al. A cross-sectional study of socio-demographic determinants of recurrent diarrhoea among children under five of rural area of Western Maharashtra, India. **Australian Medical Journal**, v. 4, n. 2, p. 72–75, 2011.

BACA, C. et al., Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas en un instituto de salud pediátrico de Lima, Peru entre enero y julio 2013. **Rev Med Hered**, v. 25, p. 73-79, 2014.

BAKER, K. K. et al. Association between Moderate-to-Severe Diarrhea in Young Children in the Global Enteric Multicenter Study ( GEMS ) and Types of Handwashing Materials Used by Caretakers in Mirzapur, Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 91, n. 1, p. 181–189, 2014.

BARDHAN, P. et al., Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1718-1723, 2010.

BASTOS, F. C. et al., Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated in the state of Para, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 607-610, 2011.

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.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence : a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.

BEHRENS, M.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P. Regulation of the Overlapping pic/set Locus in *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2915–2925, 2002.

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

BHUTTA, Z. A. et al. Global burden , distribution , and interventions for infectious diseases of poverty. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 3, n. 21, p. 1–7, 2014.

BONKOUNGOU, I. J. O. et al. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC pediatrics**, v. 13, p. 36, 2013.

BOUMGHAR-BOURTCHAI, L. et al. Macrolide-Resistant *Shigella sonnei*. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, n. 8, 2008.

CAO, Y. et al. Multi-Locus Sequence Typing ( MLST ) and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction ( REP-PCR ), characterization of *shigella* spp . over two decades in Tianjin China. **Int J Mol Epidemiol Genet** v. 3, n. 4, p. 321–332, 2012.

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.

CHANG, C. et al. Integron types , gene cassettes , antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 197–204, 2011.

CONNOR, T. R. et al. Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in *Shigella flexneri*. **eLife**, v. 4, p. 1–16, 2015.

DA CRUZ, C. B. N. et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed research international**, v. 2014, p. 539697, 2014.

DAS, J. K.; SALAM, R. A.; BHUTTA, Z. A. Global burden of childhood diarrhea and interventions. **Current Opinion Infectious Diseases**, p. 451–458, 2014.

DEBOER, M. D. et al. Annals of Epidemiology Early childhood diarrhea and cardiometabolic risk factors in adulthood : the Institute of Nutrition of Central America and Panama Nutritional Supplementation Longitudinal Study. **Annals of Epidemiology**, v. 23, n. 6, p. 314–320, 2013.

DE PAULA, C. M. D. et al., Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 966-977, 2010.

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.

EKDAHL, K.; ANDERSSON, Y. The epidemiology of travel-associated shigellosis — regional risks , seasonality and serogroups. **Journal of Infection**, v. 51, p. 222–229, 2005.

EMCH, M.; ALI, M.; YUNUS, M. Risk areas and neighborhood-level risk factors for *Shigella dysenteriae* 1 and *Shigella flexneri*. **Health & Place**, v. 14, p. 96–105, 2008.

ERDMAN, S. M. et al. Options for Treating Resistant *Shigella* Species Infections in Children. **J Pediatr Pharmacol Ther**, v. 13, n. 1, p. 29-43, 2008.

FAHERTY, C. et al. Chromosomal and Plasmid-Encoded Factors of *Shigella flexneri* Induce Secretogenic Activity Ex Vivo. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.

FARAG, T. H. et al. Housefly population density correlates with shigellosis among children in Mirzapur, Bangladesh: a time series analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2280, 2013.

FARFÁN, M. J. et al. A new multiplex PCR for differential identification of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* and detection of *Shigella* virulence determinants. **Epidemiol. Infect.**, v. 138, p.525-533, 2012.

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. 1–15, 2012.

FARSHAD, S. et al. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2879–83, 2006.

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. 90–8, 2014.

FISCHER-WALKER, C.L. et al. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS ONE**, v.7, n. 10. 2012.

FRANÇA, F. L. S. et al. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 7, 2013.

- FRANK, C. et al. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771-1789, 2011.
- GAUDREAU, C. et al., *Shigella* spp. with reduced azithromycin susceptibility, Quebec, Canada, 2012-2013, **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 854-856, 2014.
- GHOSH, S. et al. Genetic characterization of *Shigella* spp. isolated from diarrhoeal and asymptomatic children. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n.7, p. 903–10, 2014.
- GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut – a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.
- GUPTA, U. et al. Association study of inflammatory genes with rheumatic heart disease in North Indian population : A multi-analytical approach. **Immunology Letters**, v. 174, p. 53–62, 2016.
- GUZMAN, B. R. et al., A *Shigella sonnei* outbreak traced to imported basil – the importance of good typing tools and produce traceability systems, Norway, 2011. **Euro surveillance**, v. 18, n. 49, pII=20650, 2013.
- HARRINGTON, S. M. et al., The pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2465-2473, 2009.
- HOLT, K. E. et al. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. **Nat Genet**, v. 44, n. 9, p. 1056–1059, 2013.
- HOSSEINI NAVE, H. 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, mar. 2016.
- HOUP, E. et al. Microbiologic Methods Utilized in the MAL-ED Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. 225–232, 2014.
- JAFARI, F. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 20, n. 3, 2009.
- JENNISON, A. V; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection : pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 43–58, 2004.
- JOH, R. I. et al. Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual-level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 8, p. 1319–26, 15 2013.
- KANIA, D. A. et al. Genome diversity of *Shigella boydii*. **Pathogens and Diseases**, v. 74, p. 1–5, 2016.

- KEDDY, K. H. et al. Systemic shigellosis in South Africa. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 10, p. 1448–54, 2012.
- KHAN, W. A.; GRIFFITHS, J. K.; BENNISH, M. L. Gastrointestinal and extra-intestinal manifestations of childhood shigellosis in a region where all four species of *Shigella* are endemic. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64097, 2013.
- KHOT, P. D.; FISHER, M. A. Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight. **JCM**, v. 51, n. 11, p. 3711–3716, 2013.
- KIM, D. R. et al. Geographic analysis of shigellosis in Vietnam. **Health & place**, v. 14, n. 4, p. 755–67, 2008.
- KINGOMBE, C. I. B. et al., Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 239-245, 2005.
- KLONTZ, K. C.; SINGH, N. Treatment of drug-resistant *Shigella* infections Treatment of drug-resistant *Shigella* infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, n. 1, 2015.
- KOH, X. P. et al. Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 122, p. 1-8, 2012.
- KONEMAN et al., Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1785p, 2008.
- 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, p. 209–222, 2013.
- KOTLOFF, K. L. et al. Deletion in the *Shigella* Enterotoxin Genes Further Attenuates *Shigella flexneri* 2a Bearing Guanine Auxotrophy in a Phase 1 Trial of CVD 1204 and CVD 1208. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 21201, p. 1745–1754, 2004.
- KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of *Shigella* infections : implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651–666, 1999.
- KOSEK, M. et al., Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 22, p. 390-396, 2013.
- 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.
- KUO, C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolates in eight Asian countries , 2001-2004. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 41, p. 107–111, 2008.



LANATA, C. F. et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children , 5 Years of Age : A Systematic Review. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, n. 9, 2013.

LEE et al. A comparison of diarrhea severity scores in the MAL-ED multisite community based cohort study. **JPGN Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Publish Ahead of Print DOI**, 2016.

LEE, G. et al. An instrument for the assessment of diarrhoeal severity based on a longitudinal community-based study. **BMJ Open**, p. 1-10, 2014.

LEE, G. et al. Effects of Shigella-, Campylobacter- and ETEC-associated diarrhea on childhood growth. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 10, p. 1004–9, 2014.

LEVIN, K. A. Study design III : Cross-sectional studies. **Evidence-Based Dentistry**,v. 7, p. 24–25, 2006.

LI, Y. et al. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of Shigella. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 69–81, 2009.

LIMA A. A. M. et al., High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 256-259, 1995.

LIMA, A. A. M. et al. Persistent Diarrhea Signals a Critical Period of Increased Diarrhea Burdens and Nutritional Shortfalls: A Prospective Cohort Study among Children in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181,p. 1643–1651, 2000.

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.

LINDSAY, B. et al. Association between Shigella Infection and Diarrhea Varies Based on Location and Age of Children. **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. **JCM**, v. 51, n. 6, p. 1740–1746, 2013.

LIU, J. et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea : a multicentre study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 716–724, 2014.

LIU, J. et al. Simultaneous Detection of Six Diarrhea-Causing Bacterial Pathogens with an In-House PCR-Luminex Assay. **JCM**, p. 98–103, 2012.

LIU, L. et al. Global, regional , and national causes of child mortality : an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, p. 2151–2161, 2012.

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: IJMM**, v. 305, n. 4-5, p. 480–90, 2015.

MADIYAROV, R. S. et al., Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan, **Gut Pathogens**, v. 2, n. 18, p. 1-6, 2010.

MANDOMANDO, I. N. et al., Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in *Shigella* and *Salmonella* isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2450-2454, 2009

MARTINEZ-BECERRA, F. J. et al. Broadly Protective *Shigella* Vaccine Based on Type III Secretion Apparatus Proteins. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1222–1231, 2012.

MAURELLI, A. T. ***Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host – parasite interactions**. Second Edition ed. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 215–245

MCNAIRN, E.; NF, N.; DORMAN, C. J. Overexpression of the *Shigella flexneri* genes coding DNA topoisomerase IV compensates for loss of DNA e I: effect on virulence gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 507–517, 1995.

MOKHTARI, W. et al. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul , Tunisia , by molecular methods and culture techniques. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–14, 2012.

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.

NAVE, H. H. 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.

NAVIA, M. M. et al., Analysis of the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 1035-1047, 2005.

NIEHAUS, M.D. et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n. 5, p. 590-3. 2002.

NILSEN, E. et al. A *Shigella sonnei* outbreak traced to imported basil – the importance of good typing tools and produce traceability systems , Norway , 2011. n. 669, p. 1–7, 2011.

NIYOGI, S. K. Increasing antimicrobial resistance — an emerging problem in the treatment of shigellosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1141–1143, 2007.

- NIYOGI, S. K. Shigellosis. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133–143, 2005.
- NOGRADY, N. et al., Antimicrobial resistance and genetic characteristics of integrin-carrier *shigellae* isolated in Hungary. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1545-1551, 2013.
- NUNES, R. C. M. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125–128, 2012.
- OMS. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae*, 2005.
- OJHA, S. C. et al. A Pentaplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Shigella* Species. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- ORIÁ, R. B. et al. Early-life enteric infections: relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. **Nutrition Reviews Advance**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2016.
- PARSOT, C. *Shigella* spp . and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, 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, p. 1245–1251, 2011.
- PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and resistance genes among. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 301–305, 2005.
- PEIRANO, G. et al., Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.
- PENATTI et al. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 249–258, 2007.
- PETRI JR, W. A. et al. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.
- 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, p. 1-12, 2015.
- PONS, M. J. et al., Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): a retrospective analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 11, p. 315-319, 2013.
- POURAKBARI et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Shigella* species isolated in Children Medical Center Hospital, Tehran, Iran, 2001-2006. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, n. 2, p. 153–157, 2006.

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 of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10567–72, 2000.

PUTNAM, S. D. et al. Antimicrobial susceptibility trends among *Escherichia coli* and *Shigella* spp. isolated from rural Egyptian paediatric populations with diarrhoea between 1995 and 2000. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 9, 2004.

QIU, S. et al. Shift in serotype distribution of *Shigella* species in China, 2003 – 2013. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 21, p. 5–8, 2015.

QU, M. et al., An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. **Journal of Infection from Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 904-908, 2014.

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.

RAHMAN, M.Z. et al. Recovery and Characterization of Environmental Variants of *Shigella flexneri* from Surface Water in Bangladesh. **Curr Microbiol.**,v. 63, p. 372–376, 2011.

RAM, P. K. et al. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. **Epidemiology Infect**, v. 136, p. 577–603, 2008.

RANJBAR, R. et al. Development of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Three Pathogenic *Shigella* Species. **Iranian Journal of Public Health** v. 43, n. 12, p. 1657–1663, 2014.

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 : JCDR**, v. 8, n. 5, p. PC01–5, maio 2014.

RICHARD, S. A. et al. Diarrhea in Early Childhood : Short-term Association With Weight and Long-term Association With Length. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1129–1138, 2013.

RODLOFF, A. et al. Susceptible , Intermediate , and Resistant – The Intensity of Antibiotic Action. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 105, n. 39, p. 657–662, 2008.

ROSSI, O. et al. Draft genomes of *Shigella* strains used by the STOPENTERICS consortium. **Gut Pathogens**, v. 7, n. 14, p. 1–6, 2015.

ROY, S. et al. Distribution of Shigella enterotoxin genes and secreted autotransporter toxin gene among diverse species and serotypes of shigella isolated from Andaman Islands , India. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 11, p. 1694–1698, 2006.

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.

SALGADO-PABÓN, W et al. New insights into the crosstalk between Shigella and T lymphocytes. **Trend in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 192-198, 2014.

SAMBE-BA, B. et al. Community-acquired diarrhea among children and adults in urban settings in Senegal : clinical , epidemiological and microbiological aspects. 2013.

SANGEETHA, A. V et al. Clinical and Microbiological Profiles of Shigellosis in Children. v. 32, p. 580–586, 2014.

SCALAN, E. et al., Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHARF, R. J.; DEBOER, M. D.; GUERRANT, R. L. Recent Advances in Understanding the Long-Term Sequelae of Childhood Infectious Diarrhea. **Current Infectious Disease Reports**, v, 16, n. 408, p. 1-7, 2014.

SCHROEDER, G. N. et al. Molecular Pathogenesis of Shigella spp .: Controlling Host Cell Signaling , Invasion , and Death by Type III Secretion 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.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 519–542, 2004.

SEIDLEIN, L. VON et al. A Multicentre Study of Shigella Diarrhoea in Six Asian Countries : Disease Burden , Clinical Manifestations , and Microbiology. **Plos Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1156-1569, 2006.

SHEN, Y. et al., High prevalence of antibiotic resistance and molecular characterization of integron among *Shigella* isolates in eastern China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1549, 2013.

SHIFERAW, B. et al. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Shigella Isolates in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) Sites , 2000 – 2010. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, 2012.

SHIFFLETT, D. E. et al. Enteropathogenic E. coli disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. **Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology**, v. 85, n. 10, p. 1308–24, 2005.

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). **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 731–733, 2008.

SIMMS, I. et al. Intensified shigellosis epidemic associated with sexual transmission in men who have sex with men - *S higella flexneri* and *S . sonnei* in England, 2004 to end of February 2015. n. February, p. 1–5, 2015.

SOOFI, S. B. et al. A comparison of disease caused by *Shigella* and *Campylobacter* species: 24 months community based surveillance in 4 slums of Karachi, Pakistan. **Journal of infection and public health**, v. 4, n. 1, p. 12–21, 2011.

SOUSA, M.A. B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea : prevalence , antimicrobial resistance and virulence genes. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30–35, 2013.

SUNDSFJORD, A. et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS**, v. 112, p. 815-837, 2004.

TANEJA, N. et al. Cephalosporin-resistant *Shigella flexneri* over 9 years (2001–09) in India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–7, 2012.

TANG, F. et al. Spatio-temporal trends and risk factors for *Shigella* from 2001 to 2011 in Jiangsu Province, People’s Republic of China. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e83487, 2014.

TANNER, K.; BRZOVIC, P.; ROHDE, J. R. Microreview The bacterial pathogen – ubiquitin interface : lessons learned from *Shigella*. **Cellular Microbiology**, v. 17, n.1, p. 35–44, 2015.

TARIQ, A. et al. Molecular profiling of antimicrobial resistance and integron association of multidrug-resistant clinical isolates of *Shigella* species from Faisalabad , Pakistan. **Can. J. Microbiol**, v. 58, p. 1047–1054, 2012.

THE, H. C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution , adaptation and geographical spread. **Nature Publishing Group**, v. 14, p. 235–250, 2016.

THIEM, V. D. et al. Detection of *Shigella* by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2031–2035, 2004.

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

THONG, K. L. et al. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2005.

TORO, C. et al. Shigellosis in Subjects with Traveler’s Diarrhea Versus Domestically Acquired Diarrhea: Implications for Antimicrobial Therapy and Human Immunodeficiency Virus Surveillance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 3, p. 491–6, 2015.

TRÉPANIÉ, S. et al. Travel-related shigellosis in Quebec, Canada: an analysis of risk factors. **Journal of Travel Medicine**, v. 21, n. 5, p. 304–9, 2014.

TROFA, A. F.; UENO-OLSEN, H.; OIWA, R. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus. **Clinical Infectious Disease**, p. 1303–1306, 1999.

VASCONCELOS, M.J.O & BATISTA, M. Doenças diarreicas em menores de cinco anos no Estado de Pernambuco: prevalência e utilização de serviços de saúde. **Rev Bras Epidem**, v.11. 2008.

VECCHIO, A. LO et al. An international consensus report on a new algorithm for the management of infant diarrhoea. **Acta Paediatric**, v. 105, p. 384–389, 2016.

VICTORA, C. G. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 1, p. 3–5, 2009.

WALKER, C. L. F. et al., Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. **Lancet**, v. 381, p. 1405-16, 2013.

WHO. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae*, 2005.

WOODFORD, N. et al. Complete Nucleotide Sequences of Plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, Encoding CTX-M Enzymes in Three Major Escherichia coli Lineages from the United Kingdom, All Belonging to the International O25 : H4-ST131 Clone **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4472–4482, 2009.

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

YU, J. et al., Prevalence of integrons in *Shigella sonnei* from Brazil. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 607-609, 2010.

ZHANG, J. et al. Deletion of pic results in decreased virulence for a clinical isolate of *Shigella flexneri* 2a from China. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 31, p. 1–10, 2013.

ZHAO, J. et al. Rapid oligonucleotide suspension array-based multiplex detection of bacterial pathogens. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n. 10, p. 896–903, 2013.

ZHU, J. et al. Multi-drug Resistance and Characteristic of Integrons in *Shigella* spp. Isolated from China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 1, p. 56–61, 2011.


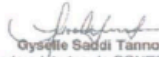
ZHU, Y. et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and the emergence of multidrug resistance in clinical isolates of *Shigella* in SiXian. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 3, p. 327–329, 2013.

ZUMSTEG, A. B. et al. IcsA Is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 4, p. 435–445, 2014.



## 11. ANEXOS

## ANEXO A - Aprovação na CONEP

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP</p> <p>PARECER Nº 366/2007</p> <p>Registro CONEP: 13523 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)</p> <p>Registro no CEP: 80/06      Processo nº 25000.184266/2006-21 Projeto de Pesquisa: "Avaliação de um teste prático para diagnóstico das diarreias (DEC) em uma unidade Hospitalar de Fortaleza - Brasil". Versão 01 de 19/10/2006. Título do Consentimento Livre Esclarecido, versão sem data. Pesquisador Responsável: Dr. Aldo A. Moreira Lima Instituição: Hospital Infantil Albert Sabin / CE Área Temática Especial: Cooperação Estrangeira/ Novos Testes Diagnósticos Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Disease – NIAID</p> <p><b>Sumário Geral do Protocolo</b></p> <p>Os objetivos do estudo são avaliar a sensibilidade e especificidade do teste DEC utilizando amostras cefálicas de crianças com sintomas de doença diarreica em unidades clínicas situadas em um país em desenvolvimento (Fortaleza-Brasil) e avaliar o efeito do teste de lactoferrina em combinação com a coprocultura para detecção de casos, quando comparado com a cultura isolada de espécimes clínicos.</p> <p>Este estudo envolverá crianças que se apresentem aos serviços de pediatria ambulatorial no Nordeste do Brasil. Será realizado na Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Ceará, com amostras coletadas no Serviço de Emergências Clínicas do Hospital Infantil Albert Sabin. Os critérios de inclusão requerem que os indivíduos apresentem 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas, e os pais autorizem se for menor de 18 anos; como fatores de exclusão, que tenham utilizado antibiótico nos últimos 30 dias e os pais não autorizarem, ou já terem sido previamente recrutados no estudo.</p> <p>Quando comparecer no serviço e concordar em participar do estudo, após assinatura do TCLE, o clínico do estudo preencherá um formulário sucinto de informações clínicas; o clínico ou enfermeiro coletará uma amostra de fezes em copo padrão, se houver emissão disponível. Se não, o clínico coletará um swab retal, e as amostras serão transportadas para o laboratório para processamento. Seis swabs e três criotubos serão preparados, sendo o primeiro para coprocultura e provas imunológicas (destino do único coletado, se não houver fezes), o segundo será inoculado em caldo MacConkey e incubado overnight, sendo o resultado da cultura preservado sob congelamento e posteriormente enviado para Seattle, assim como, 3 criotubos preenchidos com amostras fecais, etiquetados e congelados para futuras pesquisas com o DEC ou outros métodos diagnósticos; qualquer amostra restante será utilizada para os testes de lactoferrina.</p> <p>Pelo cálculo amostral apresentado, e justificando a baixa prevalência dos patógenos pesquisados, é calculado um número de 1166 indivíduos. Os dados serão enviados pela equipe do laboratório da UFC ao PATH. Na página 12 consta que o estudo é financiado pelo NIAID e NIH com projeto número U01AI61187 "A multiple point of care test for enteric pathogens".</p>	<p>Cont. Parecer CONEP 366/2007.</p> <p>O projeto é multicêntrico envolvendo a Universidade da Virgínia, Universidade Federal de Fortaleza e o Hospital Albert Sabin na mesma cidade. O país de origem é EUA, e não consta neste projeto que participará do estudo. Em projeto anexo descrevendo todo o desenvolvimento de testes diagnósticos pelo PATH, é citado que material armazenado de indivíduos de lá será utilizado, mas sem detalhes (ao redor de 500 amostras, na área de Seattle). Não fica muito claro neste projeto de onde virá este material (coletados nas clínicas de Seattle). Não tem aprovação ética do país de origem. Participam pesquisadores americanos, Matthew Steele, Bernard Weigl, Richard Guernant e mais dois co investigadores e no Brasil o investigador principal é o Prof Aldo Moreira Lima e o coordenador de campo Luis Carlos Rey, entretanto ninguém é indicado como pesquisador responsável. Há uma carta do Prof Aldo Moreira Lima destacando as vantagens para o país, dessa participação no desenvolvimento deste teste, pois ajudaria no tratamento de inúmeras crianças em nosso país.</p> <p><b>Considerações</b></p> <p>Ac se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 067/2007, cabem as seguintes considerações:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>O pesquisador respondeu adequadamente as questões colocadas, justificando o embasamento teórico que fez do problema que anteriormente se baseava em ataques terroristas. Justificou que a verba destinava-se para algo ligado a este fato;</li> <li>Justificou a não realização no país de origem, pela etiologia diferente das diarreias, alegando que nos EUA a maioria é de origem viral e não bacteriana como no local onde será realizada a pesquisa e para qual se destina o teste em desenvolvimento;</li> <li>Forneceu maiores informações sobre a coleta de material e sobre o envio desta para o exterior, respondendo satisfatoriamente às questões colocadas.</li> </ol> <p>Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.</p> <p>Situação: Protocolo aprovado.</p> <p>Brasília, 24 de abril de 2007.</p> <p> Gyselle Sadi Tannous Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS</p>
---	---

**ANEXO B - Aprovação no CEP-HIAS**

**HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HIAS

O protocolo "Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico das diarreias (DEC) em uma unidade hospitalar de Fortaleza, Brasil", versão 3.0, tradução do protocolo em inglês "Brazil DEC evaluation protocol v.3.0" foi recebido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), e foi considerado conforme o projeto DEC anteriormente submetido e já aprovado por este Comitê (Registro CONEP 13526). O CEP-HIAS considera assim o protocolo acima aprovado para sua implementação.

Fortaleza, 22 de janeiro de 2008.


---

Regina L. Ribeiro Moreno

Coordenadora do CEP-HIAS

Coord<sup>a</sup> do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Infantil Albert Sabin

## ANEXO C - Emenda ao protocolo para inclusão do CAC como local de recrutamento

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;">  <div style="text-align: center;"> <p><b>COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>  Rua Teresilene Sales 544 – Vila União Fortaleza – Ceará  Fone/Fax: (85) 3101.4212 – 3101.4283  E-mail: cep@hias.ce.gov.br</p> </div>  </div> <hr/> <p><b>Referência:</b> Protocolo CEP-HIAS Nº 80/06</p> <p><b>Título:</b> Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil, versão 5.0.</p> <p><b>Coordenadores locais do estudo:</b> Dr. Aldo A. M. Lima  Dr. Luis Carlos Rey</p> <p>Levamos ao conhecimento dos responsáveis pelo projeto “Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil”, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), analisou e aprovou a emenda ao protocolo versão 4.0, onde se prevê que o Centro de Assistência à Criança Dra. Lúcia de Fátima R. G. Sá torne-se um novo local de recrutamento de crianças com diarréia e coleta de amostras de fezes para o estudo. Esta emenda, agora aprovada, transforma a versão 4.0, datada de 25 de agosto de 2008, na nova versão 5.0 do mesmo protocolo.</p> <p style="text-align: right;">Fortaleza, 30 de outubro de 2008.</p> <div style="text-align: right;">   Regina Lúcia Ribeiro Moreno  Coordenadora do CEP-HIAS    Regina Lúcia R. Moreno  Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  Hospital Infantil Albert Sabin </div>	<div style="text-align: center;"> <p>Secretaria Municipal de Saúde  Hospital Nossa Senhora da Conceição  Conjunto Ceará – IV Etapa  Regional VI  Fortaleza – CE</p> </div> <p>À Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital Infantil Albert Sabin,</p> <p>Eu abaixo assinado, Diretora Clínica do Hospital Distrital N. Senhora da Conceição, estou ciente da pesquisa intitulada “Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarréia (Dec) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil”, e aprovo sua realização nesta Unidade Hospitalar, desde que dentro das Normas Exigidas pela Comissão de Ética do HIAS.</p> <p style="text-align: right;">Fortaleza, 03 de setembro de 2008.</p> <div style="text-align: center;">   Dra. Dr. Antônio de Pádua Siqueira  Diretor Geral    Dr. Antônio de Pádua Siqueira Martins  CREMEC: 4916-CPP 355.383.783-81  Diretor Executivo do H.N.S.C. </div>
--	--

## ANEXO D - TCLE

*Protocolo de Avaliação do DEC - Brasil, versão em português 3.0 de 25.04.2008*  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ e HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, Fortaleza, CE, BRASIL**  
**e**  
**PATH, Seattle WA, EUA**

**TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil**

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA OS PAIS**

**PESQUISADORES:**

Aldo Lima Ph.D.	Universidade Federal do Ceará (Fone: 55-85-3366-8437)
Richard Guernat M.D., Ph.D.	Universidade da Virgínia, Virgínia, EUA
Matthew Steele Ph.D., M.P.H.	PATH, Seattle, Washington, EUA
Bernhard Weigl Ph.D.	PATH, Seattle, Washington, EUA

**INTRODUÇÃO**  
 Convidamos você a permitir que seu (a) filho (a) possa participar de uma pesquisa médica. A participação dela é voluntária. Este formulário dá um resumo da informação que os pesquisadores discutirão com você. Se sua criança participar deste trabalho de pesquisa, você ficará com uma cópia deste formulário. Certifique-se de ter feito todas as perguntas que você tenha sobre esta pesquisa.

Seu filho poderá participar deste estudo porque ele está com diarreia.

**PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**  
 Este estudo está sendo feito para desenvolver um teste que ajude os médicos a conhecer a causa da diarreia. Se o novo teste funcionar, ele dirá aos médicos o que está causando a diarreia em menos de meia hora. Hoje, leva de 3 a 5 dias para saber o que causa a diarreia na criança.

Nós estamos coletando amostras de fezes das crianças da Emergência com diarreia. Gostaríamos de coletar uma pequena amostra de fezes de seu filho. Estamos planejando coletar amostras de fezes de mais de 1000 crianças que vêm a este Hospital.

Os pesquisadores e médicos do hospital estão trabalhando com pesquisadores dos Estados Unidos (EUA). Os pesquisadores americanos são do PATH, uma organização sem fins lucrativos de Seattle, estado de Washington, e a Universidade de Virgínia.

**QUEM ESTÁ PARTICIPANDO DO ESTUDO?**  
 Se você permitir deixar seu filho participar, um profissional vai examinar seu filho, fará perguntas sobre a saúde dele e sobre a diarreia. Você será interrogado sobre trabalho e tempo de estudo. O exame é uma parte de rotina no atendimento de seu filho mas as perguntas que faremos em geral não são feitas pelo médico. Se seu filho preencher os critérios de inclusão, uma amostra de fezes dele será coletada.

A pequena amostra de fezes será coletada da fralda de seu filho (se ele for menor de dois anos). Para as crianças maiores, a amostra será coletada com um recipiente. Se a criança não puder nos dar uma amostra de fezes dessa maneira, coletaremos uma pequena amostra com um swab retal. Poderemos lhe pedir de coletar uma amostra em casa e trazer para o hospital.

Utilizaremos a amostra de fezes para fazer os exames padrões para saber o que está causando a diarreia na sua criança. Uma parte da amostra será utilizada para o novo teste. Como nós não sabemos se o novo teste é correto, os resultados não podem ainda ser usados para os cuidados do seu filho ou para o tratamento.

Com sua permissão, alguma quantidade da amostra será congelada e encaminhada para PATH nos Estados Unidos. A amostra será utilizada para confirmar o estudo em testes futuros e não poderá retornar uma vez que for despachada. As amostras enviadas aos Estados Unidos não terão nomes ou outra informação que possa identificar seu filho.

**QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DESTA PESQUISA?**  
 Não há riscos conhecidos para sua criança participar deste estudo. A coleta de amostra de fezes de seu filho em um recipiente ou da fralda não causa qualquer dano. A coleta de amostra por um swab colocado no reto pode causar um desconforto passageiro. A coleta de amostra retal é uma prática rotineira em crianças com diarreia grave na Emergência para fazer exames de diagnóstico. Não é uma prática de rotina em crianças com diarreia leve.

**EXISTEM BENEFÍCIOS PARA PARTICIPAR NESTA PESQUISA?**  
 Participando este estudo, seu filho receberá o tratamento normal dos pacientes com diarreia na Emergência. Também testaremos as fezes para compreender o que está causando a diarreia. Este teste geralmente não é feito nas diarreias comuns. A informação será utilizada para ajudar no tratamento da sua criança se seu filho tiver um caso grave de diarreia que necessite ficar hospitalizado no Albert Sabin.

18 de fevereiro de 2008 Versão 4.0 Page 1 of 3

*Protocolo de Avaliação do DEC - Brasil, versão em português 3.0 de 25.08.2008*  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico anterior para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil*

O que nós vamos aprender com este estudo pode ajudar a desenvolver um novo teste para saber rapidamente a causa da diarreia. Isto vai ajudar as crianças com diarreia no futuro.

#### COMO FICA A CONFIDENCIALIDADE?

A informação que nós coletarmos e as amostras de fezes serão etiquetadas com um número da pesquisa. Nenhum nome será utilizado para os questionários ou as amostras de fezes. Somente os pesquisadores brasileiros saberão qual o código que vincula o nome da criança ao questionário da pesquisa e amostra de fezes. Os pesquisadores dos Estados Unidos não terão o vínculo de acesso ao nome da criança.

Os dados da pesquisa serão mantidos durante 5 anos depois do fim do estudo. O vínculo entre o número do estudo e o prontuário clínico da criança será destruído quando os resultados do laboratório forem colocados no prontuário. As amostras de fezes da pesquisa enviadas aos Estados Unidos serão mantidas oito anos e utilizadas em pesquisas futuras sobre diarreia.

Nenhum nome será utilizado em publicações ou apresentação dos resultados da pesquisa.

#### MEU/MINHA FILHO(A) OU EU SEREMOS PAGOS PARA PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não há pagamento para você ou seu/sua filho(a) para participar do estudo.

#### QUAIS SÃO OS DIREITOS DO MEU/MINHA FILHO(A) COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA?

Participar da pesquisa é um gesto voluntário. Você pode decidir não querer que seu/sua filho(a) participe do estudo. Você pode mudar de opinião em qualquer momento e se retirar do estudo. Sua decisão de sair do estudo não vai afetar o atendimento médico do seu filho no Hospital Infantil Albert Sabin de modo algum.

#### A QUEM DEVO CHAMAR SE TIVER PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo por favor ligue para o Dr. Aldo Lima, telefone 33668445 na Universidade Federal do Ceará.

Se você tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho como participante da pesquisa, por favor chame Dr. Regina Lúcia Moreno, da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin. Dra. Regina Lúcia pode ser encontrada no telefone local 33014193.

#### PERGUNTAS PARA CONFIRMAÇÃO DA COMPREENSÃO DO PROTOCOLO DA PESQUISA

Antes de assinar este termo de consentimento, o pesquisador lhe fará uma série de perguntas para ter certeza de que você entende a pesquisa e os direitos de seu/sua filho(a).

- |  |           |
|--|-----------|
| 1. Vai haver coleta de uma amostra de fezes neste estudo?  | SIM / NÃO |
| 2. Seu/sua filho(a) receberá atendimento e tratamento da diarreia se você não quiser participar da pesquisa? | SIM / NÃO |
| 3. Existe alguma penalidade para seu/sua filho(a) se você disser NÃO para participar da pesquisa?            | SIM / NÃO |
| 4. Seu/sua filho(a) será pago para participar da pesquisa?   | SIM / NÃO |
| 5. Amostras de fezes serão enviadas aos Estados Unidos para continuar com os estudos sobre diarreia?         | SIM / NÃO |

#### DECLARAÇÃO DOS PAIS

A pesquisa foi bem explicada para mim. Eu tive oportunidade de fazer perguntas. Eu sei a quem ligar para qualquer dúvida futura que eu possa ter. Eu concordo que meu filho participe da pesquisa. Uma cópia deste termo de consentimento me foi dada.

#### ASSINATURA DOS PAIS

Se você concorda em permitir que seu filho tome parte na pesquisa, por favor assine este formulário. Por favor, marque abaixo se aceita fazer doação de uma amostra de fezes para pesquisa posterior.

- Sim, amostra restante de fezes podem ser enviadas ao PATH nos Estados Unidos. A amostra será codificada e os pesquisadores do PATH não terão acesso ao nome da criança. Eu entendo que as amostras ficarão armazenadas durante 8 anos para confirmar a pesquisa diagnóstica.
- Não, o restante das amostras de fezes de meu filho não serão enviadas aos Estados Unidos para pesquisas futuras sobre diarreia.

Impressão do polegar do pai/mãe (se necessário)

Nome do Pai ou Responsável Legal

Assinatura do Pai ou Responsável Legal





*Protocolo de Avaliação do DEC – Brasil, versão em português 3.0 de 25.08.2008*  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico estérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil*

Eu estive presente enquanto a pesquisa foi explicada aos pais.  
Minha assinatura como testemunha certifica que o participante ou seu responsável legal assinou esta folha de consentimento informado na minha presença como ato consciente de sua vontade.

Nome da testemunha


Data

Assinatura da testemunha



Dr.ª Regina Lúcia R. Albuquerque  
Coord. Comissão de Ética em Pesquisa  
Rua Waldemar Augusto, Número 346/350



## ANEXO E - Checklist de elegibilidade para inclusão das crianças

	<p>HIAS-UFC</p> <p><i>Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil</i></p>
<b>Checklist de Elegibilidade Para o Recrutamento de Participantes</b>	
<b>1. O paciente não apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas?</b>	
SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO	SIM ___ NÃO ___
<b>2. A criança é amamentada exclusivamente ao seio?</b>	
SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO	SIM ___ NÃO ___
<b>3. A criança tomou antibiótico nos últimos 30 dias?</b>	
SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO	SIM ___ NÃO ___
<b>4. A criança estava internada por 12 h ou mais antes de vir ao HIAS?</b>	
SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO	SIM ___ NÃO ___
<b>5. A criança já participou deste mesmo estudo antes?</b>	
SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO	SIM ___ NÃO ___

## ANEXO F - Formulário de avaliação clínica

	HIAS-UFC <i>Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC)          em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil</i>
<b>Formulário de Avaliação Clínica (CRF)</b>	
	
<p>1. Data de aplicação do questionário ____/____/____</p> <p>2. Seu filho é menino (1) ou menina (2)? <span style="float: right;">Sexo ____</span></p> <p>3. Qual o dia do aniversário de seu filho? <span style="float: right;">Data de nascimento ____/____/____</span></p> <p>4. Qual a idade de seu filho(a) <span style="float: right;">____ anos ____ meses</span></p> <p>5. Quantas pessoas moram na casa da criança (inclusive)? <span style="float: right;">____ pessoas</span></p> <p>6. Quantos cômodos tem a casa onde mora a criança? <span style="float: right;">____</span></p> <p>7. Quantos cômodos a casa tem para dormir? <span style="float: right;">____</span></p> <p>8. Quantas pessoas fumam na casa? <span style="float: right;">____</span></p> <p>9. Você prepara o alimento da criança? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>10. Você lava as mãos antes de preparar o alimento da criança? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>11. A casa tem água da Cagece? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>12. A água de beber da casa é proveniente de : <span style="float: right;">____</span>  <span style="float: right;">1= CAGECE, 2= poço profundo, 3= cacimba, 4= carroça, 5= lagoa/riacho/rio, 6= outras fontes _____</span></p> <p>13. Se não possui água encanada, o que você faz antes de cozinhar ou beber a água: ____  <span style="float: right;">1= ferve 2= usa filtro 3= usa solução de cloro 4= outro _____</span></p> <p>14. A casa tem sanitário com descarga? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>15. O sanitário fica dentro da casa? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>16. Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>17. O sanitário está ligado na rede de esgoto da cidade? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>18. Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal? <span style="float: right;">____</span>  <span style="float: right;">(1= sempre, 2= frequentemente, 3= poucas vezes, 4= não ou raramente, 9= NS)</span></p> <p>19. Animais costumam ficar dentro da casa? <span style="float: right;">Sim ____ Não ____</span></p> <p>20. <u>Se sim</u>, que animais ficam dentro de casa <span style="float: right;">____</span></p>	



1= cão, 2= gato, 3= galinha, 4=outro \_\_\_\_\_

21. Quantos anos de estudos a mãe da criança completou? \_\_\_série \_\_\_grau, \_\_\_anos  
(99= NS)
22. Quantos anos de educação escolar o pai completou? \_\_\_série \_\_\_grau, \_\_\_anos
23. No último mês, qual foi a renda total da família? \_\_\_\_\_ reais/mês NS \_\_\_
24. Quantas vezes seu filho(a) evacuou ontem? \_\_\_\_\_/dia
25. Há quanto tempo seu filho(a) está com diarreia? \_\_\_ dias \_\_\_ meses \_\_\_NS
26. Teve sangue vivo nas fezes de seu filho durante algum episódio de diarreia? \_\_\_ Não  
 \_\_\_ Somente raios de sangue  
 \_\_\_ Sim  
 \_\_\_ Sim, alguém viu sangue  
 \_\_\_ Não sabe
27. Seu filho teve dor de barriga forte desde o início da doença?  
 \_\_\_ Sim, mas não foi a causa da consulta  
 \_\_\_ Sim, a dor é muito forte (choro constante, flexão do tronco)  
 \_\_\_ Não  
 \_\_\_ NS
28. A criança vomitou desde o início da doença? \_\_\_ Sim \_\_\_ Não \_\_\_ NS
29. Quantos dias a criança teve vômitos nesta doença? \_\_\_\_\_dias
30. Seu filho teve febre durante esta doença? \_\_\_ Sim \_\_\_ Não \_\_\_ NS
31. Se sim, qual a mais alta temperatura que ele teve? \_\_\_\_\_ graus C  
 \_\_\_ Não foi medida

Entrevistador \_\_\_\_\_ Data da entrevista \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_