

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Verônica Alyne Laganaro

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SUBSOROTIPOS
DE *SHIGELLA FLEXNERI* NO ESTADO DE SÃO PAULO
EMPREGANDO A TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR**

São Paulo

2018

Verônica Alyne Laganaro – RA: 000038

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SUBSOROTIPOS
DE *SHIGELLA FLEXNERI* NO ESTADO DE SÃO PAULO
EMPREGANDO A TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de
Biomedicina do Centro Universitário
São Camilo, orientado pelo Prof. Dr.
Fabio Mitsuo Lima, co-orientado
pelo Dr. Luís Fernando dos Santos
como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Laganaro, Veronica Alyne

Investigação sobre a ocorrência de subsorotipos de *Shigella Flexneri* no estado de São Paulo empregando a técnica de multiplex PCR / Veronica Alyne Laganaro. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.

42 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Reação em cadeia da polimerase multiplex 2. *Shigella flexneri* 3. Sorotipagem 4. Testes de aglutinação I. Lima, Fábio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.3

Verônica Alyne Laganaro

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SUBSOROTIPOS
DE *SHIGELLA FLEXNERI* NO ESTADO DE SÃO PAULO
EMPREGANDO A TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR**

São Paulo, 29 de outubro de 2018

Professor Orientador - Prof Dr Fábio Mitsuo Lima

Professor Examinador – Profa. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza

*Dedico este trabalho ao meu
irmão Valterubson (in memoriam)
que sempre me apoiou e me deu
forças para continuar.*

“Laços reais, são eternos”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, por todo o apoio e paciência. Em especial, ao meu pai Rafael que sempre esteve ao meu lado e me proporcionou a oportunidade de realizar mais esse sonho, a minha mãe do coração, Verônica, que sempre cuidou de mim como uma filha e não menos importante, minha vizinha Gilvanete por todo o amor, dedicação e cuidados diários. E aos meus filhos de quatro patas que sempre estiveram ao meu lado e nunca me permitiram desanimar.

Aos amigos que a biomedicina me proporcionou, sem vocês eu não teria conseguido. Em especial a Adrielle minha conselheira e biomédica exemplar, ao Keven que sempre esteve ao meu lado e a Larissa Gardiano por toda a ajuda. Pelo companheirismo e por todas os momentos tristes e felizes que passamos juntos agradeço a Yanka, Camila, Tânia, Sylvia, Grace, Murilo, Larissa Maruggi Rebecca, Juliane, Carolina, Camilla.

Ao Instituto Adolfo Lutz e ao meu orientador de iniciação científica, Luis Fernando, agradeço a oportunidade concedida e por todos os ensinamentos. Em especial, ao carinho dos meus colegas Marcos, Adriene e Bianca que fizeram sempre as minhas tardes mais felizes. E o exemplo de profissional que eu quero me tornar, a pesquisadora Elisabeth, que sempre me ajudou e ouviu todas as minhas inseguranças com muito carinho.

Aos colaboradores do Hospital do Servidor Público Municipal, local no qual realizei estágio obrigatório e conheci excelentes profissionais, que apesar das adversidades sempre se esforçaram para cumprir com suas funções de forma impecável. Em especial a Elisa e ao Marcelo, pelo carinho, os puxões de orelha e o apoio.

Ao meu querido orientador Fabio Mitsuo que não desistiu de mim nesse período, sempre se mostrou disposto a me ajudar, além de sempre também me tranquilizar e ser esse exemplo de profissional. Agradeço ao corpo docente do Centro Universitário São Camilo e aos seus colaboradores, que sempre transmitiram a nós o seu melhor diariamente.

Por fim, caso eu tenha esquecido de alguém, sou muito grata a todos que fizeram parte da minha trajetória até esse presente momento.

LAGANARO, Verônica Alyne. **INVESTIGAÇÃO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SUBSOROTIPOS DE *SHIGELLA FLEXNERI* NO ESTADO DE SÃO PAULO EMPREGANDO A TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR**. 2018. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

A *Shigella* é o agente de uma gastroenterite potencialmente grave denominada shigelose. Dentre as espécies que compõem este gênero, *Shigella flexneri* é a mais prevalente nos locais com condições socioeconômicas e de saneamento precárias. A caracterização dessas cepas associadas a casos de infecção humana é de grande importância para compreensão da epidemiologia e sobre a patogenicidade destas bactérias. Uma das formas de caracterização de isolados clínicos é a determinação do sorotipo. A técnica atualmente preconizada e utilizada no Instituto Adolfo Lutz para esta finalidade é a aglutinação em lâmina, entretanto esta técnica apresenta desvantagens, como a utilização de animais para a produção de soros e baixa especificidade de resultados. O objetivo desse projeto foi avaliar a eficácia de uma técnica de multiplex PCR na caracterização antigênica das cepas de *Shigella flexneri* isoladas no estado de São Paulo, o que inclui também a determinação de seus subtipos. Os resultados deste estudo demonstraram uma concordância de apenas 48% entre a técnica de multiplex PCR e a aglutinação em lâmina. Deste modo, o método molecular apresentou uma especificidade consideravelmente superior ao método fenotípico. O uso rotineiro do multiplex PCR possibilita uma melhoria na caracterização antigênica de cepas *Shigella flexneri*, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção de shigelose, que poderão contribuir futuramente para a criação de uma vacina como estratégia de controle da doença.

Palavras-chave: Reação em cadeia da polimerase multiplex. *Shigella flexneri*. Sorotipagem. Testes de aglutinação.

LAGANARO, Verônica Alyne. **RESEARCH ON THE OCCURRENCE OF SHIGELLA FLEXNERI SUBSOROTYPES IN THE STATE OF SÃO PAULO EMPLOYING THE MULTIPLEX PCR TECHNIQUE.** 2018. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Shigella is the agent of a potentially serious gastroenteritis called shigellosis. Among the species that make up this genus, *Shigella flexneri* is the most prevalent in places with poor sanitation and socioeconomic conditions. The characterization of these strains associated with cases of human infection is of great importance for understanding the epidemiology and pathogenicity of these bacteria. One of the forms of characterization from clinical isolates is the determination of the serotype. The technique currently recommended and used at the Adolfo Lutz Institute for this purpose is slide agglutination, however this technique has disadvantages, such as the use of animals for production of serum and low specificity of results. The objective of this project was to evaluate the efficacy of a multiplex PCR technique in the antigenic characterization of strains of *Shigella flexneri* isolated in the state of São Paulo, which also includes the determination of their subsorotypes. The results of this study demonstrated a concordance of only 48% between the PCR multiplex technique and the slide agglutination. Thus, the molecular method had considerably higher specificity than the phenotypic method. The routine use of multiplex PCR allows an improvement in the antigenic characterization of *Shigella flexneri* strains, as well as providing subsidies for the development of new strategies for controlling and preventing shigellosis, which may contribute in the future to create vaccine as a strategy to control the disease.

Keywords: Multiplex polymerase chain reaction. *Shigella flexneri*. Serotyping. Agglutination tests

Lista de figuras

Figura 1 - Mecanismo da patogênese da <i>Shigella</i>	14
Figura 2 - Metodologia da Reação de Cadeia Polimerase (PCR)	18
Figura 3 - Fórmula para calcular índice de concordância	25
Figura 4 - Gel de agarose representativo do perfil de amplificação por multiplex PCR dos subsorotipos de <i>Shigella flexneri</i> com destaque para os perfis 5a, X e Y, pesquisados nesta nova etapa do estudo	27
Figura 5 - PCR multiplex para o subsorotipos 1a e 1b	28
Figura 6 - PCR multiplex para o subsorotipos 2a e 2b	29
Figura 7 - PCR multiplex para o subsorotipos 3a e 3b	29
Figura 8 - PCR multiplex para o subsorotipos 4a e 4b	30
Figura 9 - Comparação entre os resultados obtidos no ensaio de aglutinação em lâmina com o obtido pelo multiplex PCR com as amostras da rotina	31
Figura 10 - PCR multiplex para o subsorotipos 5a e 5b	32
Figura 11 - PCR multiplex para os sorotipos Y e X	32
Figura 12 - Comparação entre os resultados obtidos no ensaio de aglutinação em lâmina com o obtido pelo multiplex PCR com as amostras da rotina	33
Figura 13 - Análise da qualidade dos eletroferogramas utilizando o software <i>Eletropherogram Quality Analysis</i>	34
Figura 14 - Eletroferograma representativo do gene <i>wzx</i> da cepa de referência para o subsorotipo 1a	35
Figura 15 – Alinhamento representativo do produto obtido no sequenciamento do subsorotipo 1a com a sequência depositada no <i>GenBank</i> , por intermédio do programa <i>clustalW</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T3SS	Type III secretion system
pINV	Plasmídeo de virulência
IpaH	Antígeno do plasmídeo de invasão H
SepA	Serino-protease
IEC	Célula epitelial intestinal
IcsA ou VirgA	Proteína de superfície
RNA^t	Ácido ribonucleico transportador
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
NDEI	Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais
IAL	Instituto Adolfo Lutz
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo soja tripticaseína
UV	Ultravioleta
PhPh	Electropherogram quality analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
M	Marcador de peso molecular

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de abreviaturas e siglas

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Amostras bacterianas.....	21
3.2 Obtenções de DNA para técnicas moleculares	21
3.3 Avaliação do DNA obtido	22
3.4 Padronização do multiplex PCR	22
3.5 Subsorotipagem molecular de cepas de <i>Shigella flexneri</i> isoladas de infecções humanas no Estado de São Paulo	24
3.6 Sequenciamento por método de Sanger	24
3.7 Cálculos dos índices de concordância e discordância	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A *Shigella* é um patógeno estritamente humano, membro da Família *Enterobacteriaceae*, e caracteriza-se por ser um bacilo Gram negativo imóvel, não formador de esporos, aeróbio facultativo, fermentador da glicose com produção de ácido, desprovido da capacidade de fermentar a lactose, de produzir gás, hidrolisar a ureia e de descarboxilar o aminoácido lisina e não possui cápsula (exceto *Shigella flexneri* e *Shigella boydii*). Além disso, não utilizam citrato nem acetato de sódio como única fonte de carbono (MURRAY et al., 2007; MURRAY

O gênero *Shigella* é composto por quatro espécies: *Shigella dysenteriae* (sorogrupo A; 13 sorotipos), *Shigella flexneri* (sorogrupo B; 6 sorotipos), *Shigella boydii* (sorogrupo C; 18 sorotipos) e *Shigella sonnei* (sorogrupo D; 1 sorotipo) (BARRY et al., 2013; JAWETZ et al., 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), sendo dividida em duas formas, denominadas formas I (lisa) e II (rugosa). As espécies *S. flexneri* e *S. sonnei* são responsáveis pela maioria dos casos de doença registrados, tanto em crianças quanto em adultos, sendo a *S. sonnei* diferenciada facilmente das demais devido a positividade na reação de descarboxilação (MURRAY et al., 2007; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Um dos principais agentes etiológicos de doença diarreica em praticamente todas as partes do mundo, são as bactérias do gênero *Shigella*. Dentre os dados epidemiológicos, no estado de São Paulo, esta bactéria é responsável por aproximadamente 2% dos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos/Água notificados a Central de Vigilância Epidemiológica, envolvendo uma média de, 396 pessoas por ano (http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/201315shigella_revisado.pdf).

Ademais, as bactérias do gênero *Shigella* são consideradas um relevante problema de Saúde Pública devido à alta incidência de infecções em algumas regiões e eventual gravidade dos quadros clínicos, principalmente em crianças menores de cinco anos de vida (VON SEIDLEN et al., 2006; KOTLOFF et al., 2013; CDC, 2014). No Brasil, é observado uma predominância da *S. flexneri*

sobre a *S. sonnei*, sendo que a região sudeste apresenta taxas mais altas de 'shigelose' ou 'disenteria bacilar' (39%), modo pelo qual essa doença é nomeada clinicamente, seguida da região nordeste (34%), apresentando pouca ocorrência no sul do país (3%) (DA CUNHA et al., 2017).

A 'shigelose' manifesta-se a partir de 12 a 20 horas após a infecção, ou seja, têm períodos de incubação mais longos e possui uma dose infectante muito baixa, da ordem de 10 a 100 células do microrganismo. O contato inicial da bactéria com o hospedeiro que se dá de forma direta pessoa-pessoa por transmissão fecal-oral ou, indiretamente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados, sendo sua transmissão relacionada à falta de higiene e deficiência de saneamento básico (TORTORA, CASE, FUNKE, 2005; MINISTERIO DA SAUDE, 2009; FOCCACIA, VERONESI, 2010; NYOGI, 2015).

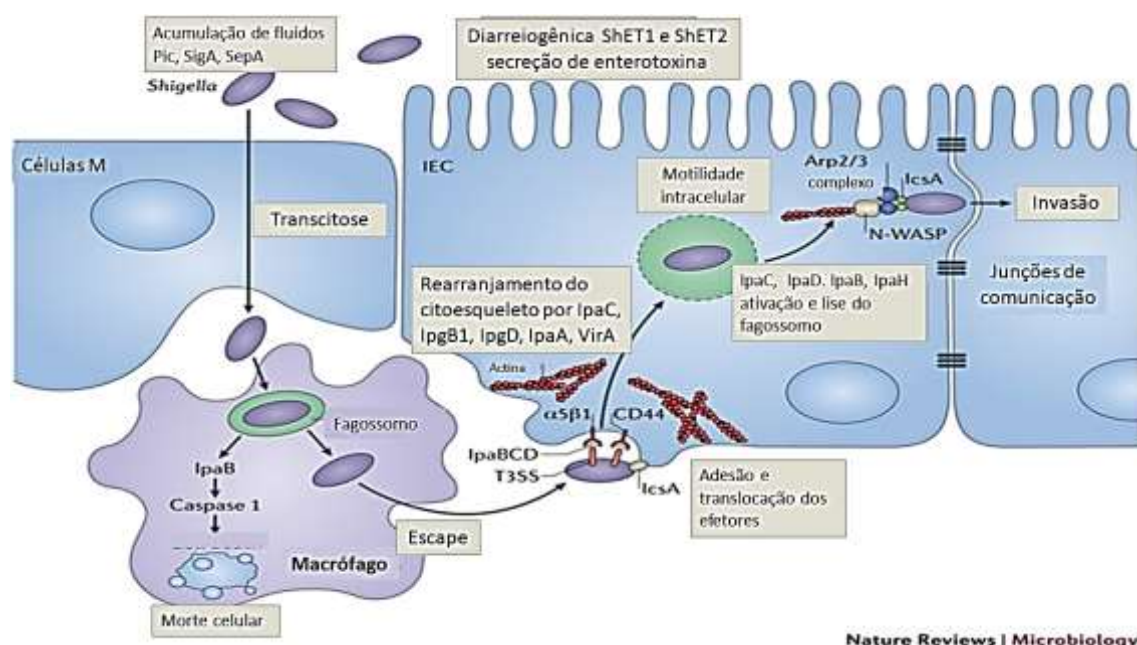
Após a ingestão, a bactéria aloja-se no íleo terminal e cólon, caracterizando-se por uma invasão e destruição da camada epitelial da mucosa. Uma vez dentro da célula as bactérias se multiplicam liberando toxina Shiga, fazendo com que ocorra a destruição dos tecidos, promovendo assim uma intensa reação inflamatória, além de acarretar múltiplos episódios de diarreia (podendo chegar até 20 evacuações em um dia), com a presença de muco e sangue no material fecal. Podem também ocorrer outros sintomas como febre, vômito e intensa dor abdominal (NYOGI, 2015; FOCCACIA, VERONESI, 2010; MINISTERIO DA SAUDE, 2009; TORTORA, CASE, FUNKE, 2005).

O processo infeccioso é normalmente auto-limitante, mas pode se agravar em indivíduos imunocomprometidos e crianças. Caso medidas adequadas de tratamento não forem instituídas, podem ocorrer uma invasão da *Shigella* na circulação do paciente. Em casos graves de shigelose, é necessária reidratação oral e a antibioticoterapia é preconizada, visando à diminuição da duração e gravidade da doença e do período de eliminação da bactéria (NYOGI, 2015; FOCCACIA, VERONESI, 2010; MINISTERIO DA SAUDE, 2009; TORTORA, CASE, FUNKE, 2005).

A patogênese das infecções por *Shigella* tem como mecanismo central a invasão das células da mucosa do intestino grosso pela bactéria (figura 1). Este mecanismo acontece em etapas distintas, sendo orquestrado pelo sistema de

secreção Mxi-Spa tipo III (T3SS- type III secretion system), que é expresso e formado a 37°C, ativado pelo contato com a célula-alvo e diversas proteínas efetoras codificadas no plasmídeo de virulência (pINV), incluindo o antígeno do plasmídeo de invasão H (IpaH), IpaB, ipaC, ipaD, ial, virF, serino-protease (SepA) dentre outras. Esse sistema permite a translocação de proteínas efetoras bacterianas de modo direto para o citoplasma das células eucarióticas-alvos. Além dos genes plasmidiais, genes cromossômicos como iuc, set1A, set1B, sat, pic e sigA também contribuem para a instalação da infecção (HAO et al., 2012; SANSONETTI, 2001).

Figura 1 - Mecanismo da patogênese da *Shigella*.



Fonte: Adaptado de (HAO et al., 2016).

Nota: Legenda: Primordialmente, a *Shigella* atravessa o epitélio intestinal através de micropregas (célula M), sendo este processo denominado transcitose. A bactéria é fagocitada, mas escapa da destruição por induzir a rápida apoptose de macrófagos através de uma via dependente da caspase 1. Depois da sua liberação, a bactéria entra em contato com o lado basolateral de uma célula epitelial intestinal (IEC) e começa a induzir a endocitose mediada por efetores. A estrutura Mxi-Spa T3SS é revestida pela proteína *IpaB* na ponta, e a *IpaB* tem alta afinidade por áreas de membranas celulares eucarióticas ricas em colesterol. A adesão da *Shigella* em uma IEC ocorre pela ligação de *IpaB* e *IpaBCD* ao receptor hialurônico do hospedeiro CD44 e por intermédio da

integrina $\alpha 5\beta 1$, respectivamente. O IcsA funciona como uma adesina essencial para promover o contato com as IECs do hospedeiro, facilitando desde modo a fusão do aparelho T3SS e da membrana da célula hospedeira, levando à translocação de outros efetores. Esse envolvimento requer extensa reorganização do citoesqueleto da célula hospedeira e modulação de outras vias intracelulares, recrutando a atividade dos efetores bacterianos *IpaC*, *IpgB1*, *IpgD*, *IpaA* e *VirA* em concerto. Após a invasão, ocorre rapidamente a ativação do *IpaC*, *IpaD*, *IpaB*, *IpaH* e a lise do fagossomo circundante. A motilidade intracelular da *Shigella* é mediada pelo IcsA através do recrutamento da proteína neural Wiskott-Aldrich do hospedeiro (N-WASP) e à actina (ARP 2/3 complexo), criando um local para polimerização direcional de actina para impulsionar a bactéria através do citoplasma.

Dentre este conjunto de genes que participam da patogênese da Shigelose, o gene *IpaH* é rotineiramente utilizado para a detecção e identificação molecular da *Shigella*. Além de estar presente em inúmeras cópias no plasmídeo bacteriano, encontra-se também no cromossomo sendo responsável por codificar proteínas envolvidas no processo de sobrevivência da bactéria em macrófagos e no processo de invasão nas células hospedeiras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

São 12 genes *ipaH*, que diferem pelos locais de reconhecimento dos substratos que vão resultar em funções diferentes durante sua patogênese. A bactéria induz um processo de endocitose na célula do hospedeiro, por meio do *ipaB* e *ipaC*, que formam um complexo que interage com a membrana da célula epitelial formando um poro, pelo qual ocorre a translocação de outras proteínas para o citoplasma da célula eucariótica, sendo essa passagem mediada pela combinação do *ipaB* e *ipaD*. A fagocitose se dá por meio de rearranjos do citoesqueleto realizados por *ipaA* e *ipaC*, sendo o *ipaC* responsável por induzir a polimerização de actina e a formação de projeções na membrana, e o *ipaA* induz a despolimerização da actina ligando-se a vinculina (proteína de adesão focal que regula o ancoramento dos filamentos de actina na membrana celular), formando uma estrutura estável que promove a entrada da bactéria no interior da célula, espalhando-se rapidamente pelas células adjacentes. O *ipaB* é responsável pela lise da membrana dos vacúolos endocíticos nos macrófagos, pela ligação da proteína em questão com a caspase cisteína protease, ou nas

células epiteliais do hospedeiro que foram o local de entrada da bactéria (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O diagnóstico laboratorial clássico da shigelose é realizado por meio da pesquisa da bactéria nas fezes de indivíduos com sintomas de gastroenterite. Este envolve a cultura do material (coprocultura) em meios seletivos e diferenciais, como ágar MacConkey, ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato e ágar *Salmonella-Shigella*, seguido de provas bioquímicas em meios presuntivos de identificação específicos para enterobactérias. Após a identificação laboratorial essas cepas precisam ser caracterizadas para fins de vigilância epidemiológica. Esta caracterização envolve a pesquisa de alguns genes de virulência, a determinação do perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos e a tipagem, que pode ser feita por meio de métodos fenotípicos ou moleculares (EWING, 1986; MURRAY, et al., 2007).

Uma das formas mais importantes de tipagem da *Shigella* para fins epidemiológicos é a determinação de seu sorotipo, que visa identificar os chamados antígenos somáticos existentes na parede celular bacteriana. Para tanto, emprega-se a técnica de aglutinação em lâminas, que se baseia em uma reação antígeno-anticorpo, na qual os sorotipos são obtidos por meio da aglutinação de culturas puras com soros polivalentes somáticos e em sequência com os soros monovalentes para uma sorotipagem mais específica. (EWING, 1986; SERIBELLI, 2016; ZHANG, 2014).

Embora esta técnica seja considerada o “padrão-ouro” para sorotipagem, e venha sendo empregada por muitos anos em laboratórios de referência de diversos países, ela apresenta desvantagens. Trata-se de uma metodologia de execução demorada devido ao grande número de sorotipos de *Shigella* existentes, sendo preciso a realização de uma reação individual para cada sorotipo (SIMMONS, ROMANOWSKA, 1987).

O método requer rigorosa padronização, desde a produção dos antissoros até a execução da técnica e interpretação dos resultados, sendo esta última etapa particularmente problemática, devido a subjetividade envolvida na leitura da intensidade das reações e pela possibilidade da existência das chamadas formas “rugosas” de *Shigella*, que ocorrem devido a alterações químicas da

parede celular bacteriana, tornando as cepas auto aglutinantes (SIMMONS, ROMANOWSKA, 1987).

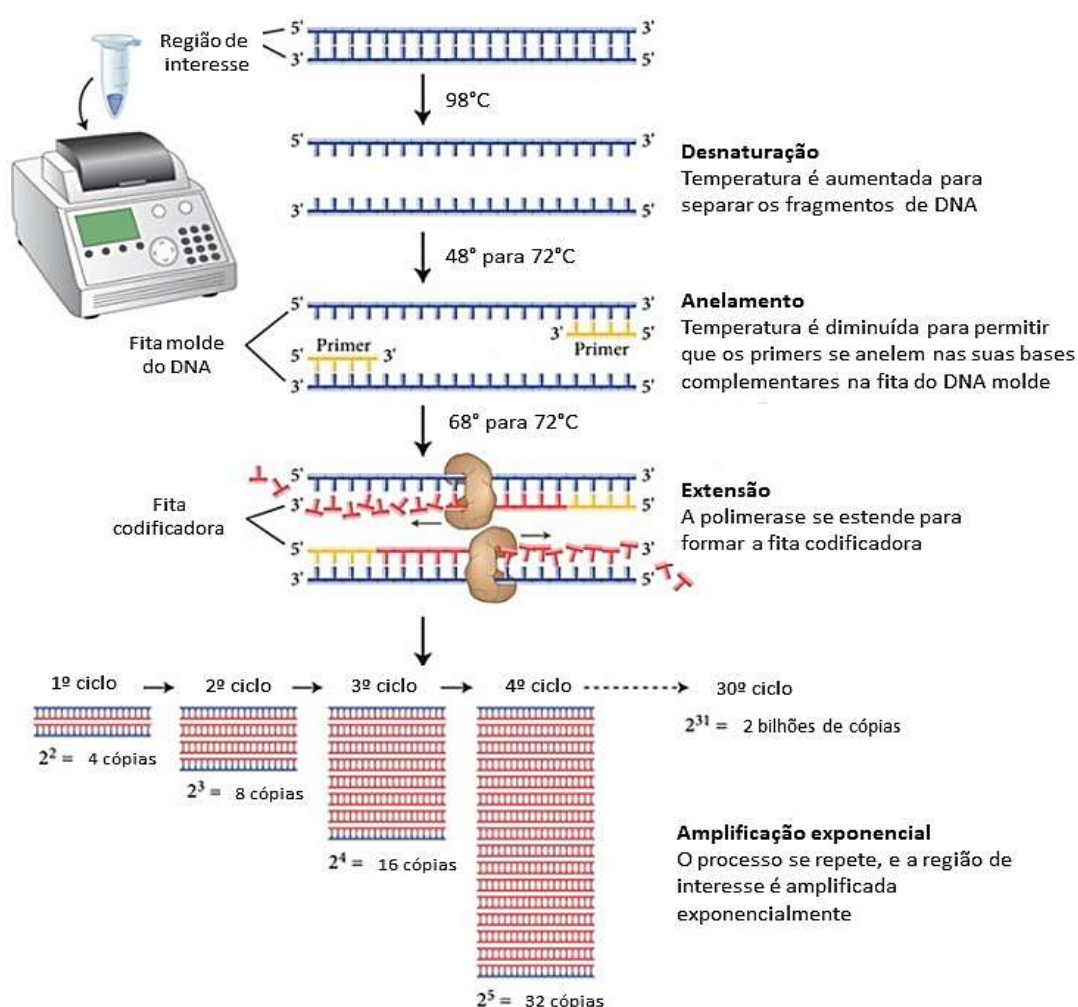
Estes fatos requerem que a interpretação de um ensaio de sorotipagem seja feita apenas por profissionais bastante experientes. Com relação à etapa de produção dos antissoros, há dificuldades na aquisição das cepas padrão para o preparo dos antígenos, pois tais cepas estão disponíveis em poucos laboratórios e centros de referência internacionais, e atualmente as inúmeras restrições à circulação de bactérias patogênicas como a *Shigella*, que são consideradas armas biológicas, tornam a importação deste tipo de material cada vez mais difícil. Outro aspecto desfavorável em relação ao atual método de sorotipagem está no uso de animais para produção dos antissoros, sendo a licitude desta prática altamente questionada pela sociedade nos dias atuais, principalmente quando métodos alternativos podem ser empregados (EWING, 1986; SERIBELLI, 2016; ZHANG, 2014).

Considerando todos estes inconvenientes relacionados à metodologia de aglutinação em lâmina, alguns estudos têm descrito o desenvolvimento de técnicas moleculares tanto para a determinação de sorotipos (LI et al., 2009; SUN et al., 2011) como para a determinação de espécies de *Shigella* (OJHA et al., 2013). Um estudo descreveu um método molecular para pesquisa de sorotipos e subtipos de cepas de *S. flexneri*. Foi desenvolvido um ensaio de PCR multiplex com base no gene de síntese de antígenos O-wzx e os genes de modificação do antígeno O (*gtrI*, *gtrIC*, *gtrII*, *oac*, *gtrIV*, *gtrV* e *gtrX*) (SUN et al., 2011).

Na *S. flexneri* a variação da estrutura do antígeno O é mediada por bacteriófagos e plasmídeos portadores de genes. Os bacteriófagos geralmente se integram como profagos no cromossomo *thrW* no locus do RNAt, para os profagos transportarem a glicosilação (*gtr*) operon, ou para o sitio *argW* RNAt, para aqueles portadores do gene da O-acetilação (*oac*), acarretando dessa forma em alterações na estrutura do antígeno O. Os bacteriófagos Sfl, SflI, Sf6, SfIV, SfV e SfX, modificadores do antígeno O convertem *S. flexneri* Y em sorotipos 1a, 2a, 3b, 4a, 5a e X, respectivamente (HAO et al., 2016).

A técnica de PCR (reação de cadeia polimerase) (figura 2), para enterobactérias é uma metodologia fácil e rápida de ser realizada, com a vantagem de diminuir muito o tempo de identificação desses patógenos. Alguns estudos comparativos mostraram que, para identificar enteropatógenos, a sensibilidade e a especificidade da PCR foram muito similares as das metodologias convencionais, quando não superiores (LODISH et al, 2014).

Figura 2 - Metodologia da Reação de Cadeia Polimerase (PCR).



Fonte: Adaptado de (<http://scienceblogs.com.br/synbiobrasil/page/2/>).

Para verificação dessa especificidade é comum a utilização do sequenciamento, a opção no caso, da utilização do método Sanger ocorreu

devido sua possibilidade de promover sequências de alta qualidade para trechos relativamente longos (por volta de 900 pares de base). A ideia por trás desse método é sintetizar um conjunto de fitas-filhas a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado. As novas fitas apresentam terminação precoce da polimerização pelo uso de didesoxinucleotídeos marcados com marcadores fluorescentes. (LODISH et al, 2014).

Uma outra vantagem ao se utilizar métodos moleculares é a detecção até mesmo quando há números reduzidos de bactérias, característica importante de infecções causadas por *Shigella*, na qual poucos microrganismos já podem desencadear a doença, sendo o método por multiplex PCR útil para a detecção de subtipos. O conhecimento sobre a prevalência de sorotipos e subsorotipos é de suma importância, pois por ser esta a mais comum das espécies em diversos países do mundo, incluindo algumas regiões do Brasil (BASTOS et al., 2012), há atualmente um grande interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de uma vacina que possa diminuir o número de casos de shigelose por *Shigella flexneri*, e para que esta estratégia seja eficaz a composição desta vacina deve obrigatoriamente contemplar os principais sorotipos e subsorotipos circulantes da bactéria (LIVIO et al., 2014; VAN DE VERG, VENKATESAN, 2014).

2. OBJETIVO

Validar e avaliar a eficácia de uma técnica molecular, baseada na metodologia de multiplex PCR, como ferramenta alternativa para a determinação de sorotipos, incluindo os fatores antigênicos secundários (subsorotipos) da bactéria *Shigella flexneri*.

2.1 Objetivos específicos

Desenvolver o método de detecção de *S. flexneri* por multiplex PCR.

Comparar os resultados do método molecular ao método de sorotipagem por aglutinação em lâmina.

Observar a ocorrência dos diferentes subsorotipos de *S. flexneri*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as etapas descritas a seguir foram realizadas nas dependências do Centro de Bacteriologia, no Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais (NDEI), do Instituto Adolfo Lutz.

3.1 Amostras bacterianas

Foram empregadas neste estudo 164 cepas bacterianas bioquimicamente identificadas como *Shigella flexneri* e previamente caracterizadas pelo método de aglutinação em lâmina quanto ao antígeno somático (1-5), isoladas de casos de infecção humana no Estado de São Paulo, em diferentes períodos de tempo.

Adicionalmente foram empregadas cepas de referência para os seguintes sorotipos/subsorotipos descritos para a espécie *Shigella flexneri*: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 5a, 5b, X e Y. Tais cepas de referência são provenientes da coleção do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) ou foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) em anos diversos para participação em ensaios de proficiência internacional. Todas as cepas em análise foram reativadas a partir de estoques armazenados em temperatura ambiente (meio gelose) ou culturas congeladas a -20°C, isoladas novamente em TSA, e testadas novamente para a presença do gene *ipaH* (antígeno plasmidial de invasão), marcador genotípico específico do gênero *Shigella* (THIEM, 2014). A partir da confirmação destas características, novos estoques em ágar gelose foram preparados e empregados nas diversas etapas do estudo.

3.2 Obtenções de DNA para técnicas moleculares

O DNA molde empregado nas reações de PCR e multiplex PCR foi obtido por lise térmica (método de fervura). As amostras foram semeadas em tubos de ensaio com caldo TSB, incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente cultivadas em placas de TSA para obtenção de colônias isoladas para extração do DNA e testadas em meio IAL. Para a extração do DNA bacteriano utilizou-se a técnica de termo-extração, sendo utilizado o crescimento bacteriano. Uma alíquota de crescimento de uma colônia isolada foi transferida para para microtubos com 400 µL de água MilliQ estéril, sendo submetida a 100°C em banho-seco (termobloco) por 15 min. Após essa etapa, a suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm (16845xg) em microcentrífuga refrigerada (mod. NT-

805, Nova Técnica). Este material foi mantido em freezer até o momento do uso, no qual foi usado 5 μ l para cada reação do multiplex PCR (COSTA, et al., 2010).

3.3 Avaliação do DNA obtido

O DNA extraído foi testado por PCR convencional pela presença do gene *ipaH*, marcador genotípico específico do gênero *Shigella*. A partir da confirmação desta característica, novos estoques em ágar gelose foram preparados e empregados nas diversas etapas do estudo.

3.4 Padronização do multiplex PCR

Para os ensaios de padronização da reação de multiplex PCR foram empregadas apenas cepas de referência dos diferentes sorotipos de *Shigella flexneri*, conforme mencionado no item 3.1.

A reação de multiplex PCR empregada neste estudo teve por base o ensaio descrito por SUN et al. (2011). Inicialmente os genes-alvo envolvidos na reação foram amplificados em reação individuais de PCR, com a finalidade de testarmos diferentes marcas de kits para PCR. Além disto, esses testes também tiveram a finalidade de confirmar se a temperatura de anelamento proposta no artigo científico que embasou este estudo era de fato a mais adequada para o conjunto de primers empregados (Tabela 1). Foram empregados mix de PCR das marcas *Promega*, *DNA express*, *Qiagen* e *Invitrogen*. Com relação à temperatura de anelamento foram testados valores compreendidos entre 57 e 61 °C. Os demais parâmetros de amplificação seguiram essencialmente o método de SUN et al. (2011). Todas as reações de PCR foram realizadas no sistema Proflex (Applied Biosystems).

Tabela 1: Primers empregados no presente estudo.

Gene alvo	Primers	Sequência do primer (5'- 3')	Amplicon (bp)	Sorotipo específico	REFERÊNCIA
<i>lpaH</i>	F	CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG	933	Todos	Peresi et al., 2016.
	R	GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC			
<i>gtrI</i>	F	CTGTTAGGTGATGATGGCTTAG	1.122	1a, 1b, 1c	Sun et al., 2011
	R	ATTGAACGCCTCCTTGCTATGC			
<i>gtrII</i>	F	ATTTATTGTTATTGGGGGTGGTTG	1.272	2a, 2b	Sun et al., 2011
	R	ATTTGTTCTTTATTTGCTGGT			
<i>oac</i>	F	CTGTTCGGCTTTGAAAGTGCTG	604	1b, 3a, 3b, 4b	Sun et al., 2011
	R	CGTAGGCGTACATAGCAAGCAAAGA			
<i>gtrIV</i>	F	ATGTTCCCTCCTTCTTCCTTT	378	4a, 4b	Sun et al., 2011
	R	TCCTGATGCTACCTTATCCA			
<i>gtrV</i>	F	AATACGATTCTCCTGGTGCTAAAC	905	5a, 5b	Sun et al., 2011
	R	TAGGGCATTGCTTGTATCTTTCAT			
<i>gtrX</i>	F	AATGCTGGATGGGATAATCACCTT	425	2b, 3a, 5b, X, Xv	Sun et al., 2011
	R	GAGACGGCTTCTCCATGTTTTGCT			
<i>WZX₁₋₅</i>	F	CACTTGTTGGGTATGCTGG	782	1-5, X, Xv, Y	Sun et al., 2011
	R	CCGGCAAACAGATTAGAAA			
<i>gtrIC</i>	F	AGGGAATGGCATTAGGGATCGG	518	1c	Sun et al., 2011
	R	GCTGCAAGTGGTTTTTGTGGA			

Após a padronização da reação de PCR de modo individual, a reação de multiplex PCR foi então realizada. Os parâmetros empregados nestes ensaios foram semelhantes ao proposto por SUN et al. (2011). Os produtos de amplificação foram sempre analisados em géis de agarose a 2%. Os géis foram

corados com brometo de etídio e visualizados no transluminador de luz UV com fotodocumentador.

3.5 Subsorotipagem molecular de cepas de *Shigella flexneri* isoladas de infecções humanas no Estado de São Paulo

A investigação de subtipos de cepas de *Shigella flexneri* associadas a infecções humanas no Estado de São Paulo, em diferentes períodos de tempo, foi realizado por multiplex PCR de acordo com o descrito no item 3.4. O critério empregado para seleção destas cepas de *Shigella flexneri*, foi a existência de dados prévios de sorotipagem no acervo de registro do NDEI/CB. Tais cepas, após serem selecionadas, foram isoladas em meio nutritivo TSA e tiveram características fenotípicas e genotípicas confirmadas, como descrito para as cepas de referência (item 3.1). Igualmente, a obtenção de DNA molde para as reações de multiplex PCR foi realizada conforme o item 3.2. As cepas de referência anteriormente empregadas na padronização da reação de multiplex PCR foram, nesta etapa, empregadas como controle positivo. A cepa de *E. coli* K12:H5 foi empregada como controle negativo.

3.6 Sequenciamento por método de Sanger

Para verificação da especificidade dos produtos obtidos pela técnica de Multiplex PCR os amplicons de cada um dos genes citados na tabela acima, com a exceção do gene ipaH foram sequenciados pelo método de Sanger. Após a amplificação dos genes por PCR em reações individuais foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2% para verificação dos produtos obtidos. O gel foi corado por imersão em solução de brometo de etídio e visualizado por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (UV). Os amplicons foram purificados utilizando o kit CENTRI-SEP Columns (Applied Biosystems, USA) e após as purificações, novamente avaliadas por eletroforese em gel de agarose. Em seguida foram quantificados por espectrofotometria (Nanodrop® ND-1000).

Os iniciadores utilizados para as reações de dideoxi-terminal de sequenciamento foram os mesmos que foram empregados na amplificação dos genes-alvo, descritos na tabela 1, porém em uma concentração de 0,24 $\mu\text{mol/mL}^{-1}$ e para este procedimento foi utilizado o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®).

Para a montagem de cada fita consenso foi utilizado o software *Electropherogram Quality Analysis* (PhPh) da EMBRAPA; para a verificação de qualidade dos eletroferogramas obtidos foi utilizado um software de domínio público BioEdit 7.0.9, sendo estes analisados para verificação da qualidade da leitura do sequenciamento (HALL, 1999). As sequências gênicas obtidas na reação de sequenciamento foram comparadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), através do sistema BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), além de também ser feita uma verificação do correto alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento realizado com as depositadas no *GenBank*®, por intermédio do programa *ClustalW*.

3.7 Cálculos dos índices de concordância e discordância

Foi utilizado, para comparação dos resultados entre a técnica de aglutinação e a técnica de PCR, o índice de concordância, de acordo com a fórmula abaixo:

Figura 3 - Fórmula para calcular índice de concordância.

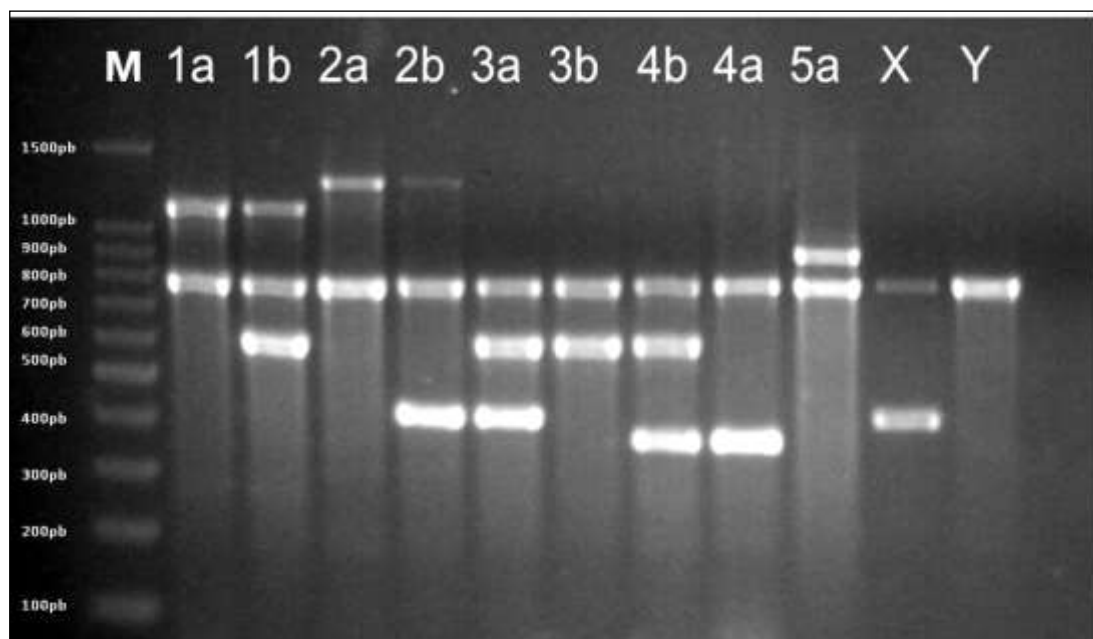
$$\text{Índice de concordância} = \frac{\text{Concordâncias}}{\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}} \times 100$$

4. RESULTADOS

Foram realizadas reações individuais de PCR com as cepas de referência para verificação da eficácia de amplificação de cada gene-alvo, para cada sorotipo/subsorotipo específico, de *Shigella flexneri*. Observou-se que em algumas cepas de referência os perfis de amplificação desejado não foram compatíveis com o esperado, de acordo com SUN et. al (2011). Desta maneira, cepas adicionais provenientes de ensaios de proficiência internacional os quais o IAL se submete anualmente, foram selecionadas e empregadas como controle em novos ensaios de PCR para verificação da correta amplificação dos genes-alvo.

Nestes novos ensaios os genes-alvo puderam ser corretamente amplificados, indicando que os primers empregados eram adequados para uso. Deste modo, obtivemos, para as cepas de referência (Figura 4), os perfis esperados para os genes *gtrI* e *wzx* (subsorotipo 1a), *gtrII* e *wzx* (subsorotipo 2a), *gtrIV* e *wzx* (subsorotipo 4a), *gtrIV*, *gtrX* e *wzx* (subsorotipo 4b), *gtrV* e *wzx* (subsorotipo 5a), *gtrX* e *wzx* (sorotipo X) e *wzx* (sorotipo Y). As cepas de referência empregadas como controle foram 1a, 2a, 3a, 4a, 4b, 5a, X e Y. As cepas provenientes de ensaio de proficiência 2016.1 (1b), 07/4269 (2b), 06/2596 (3a), 2016.3(3b), foram selecionadas como controles positivos para a etapa seguinte de padronização da reação de Multiplex PCR. A cepa de referência correspondente ao perfil 5b não apresentou os produtos de amplificação esperados em nenhuma reação que foi submetida, consequentemente esta cepa foi retirada das investigações posteriores e nenhuma cepa dentro do sorotipo 1 apresentou perfil compatível com subsorotipo 1c.

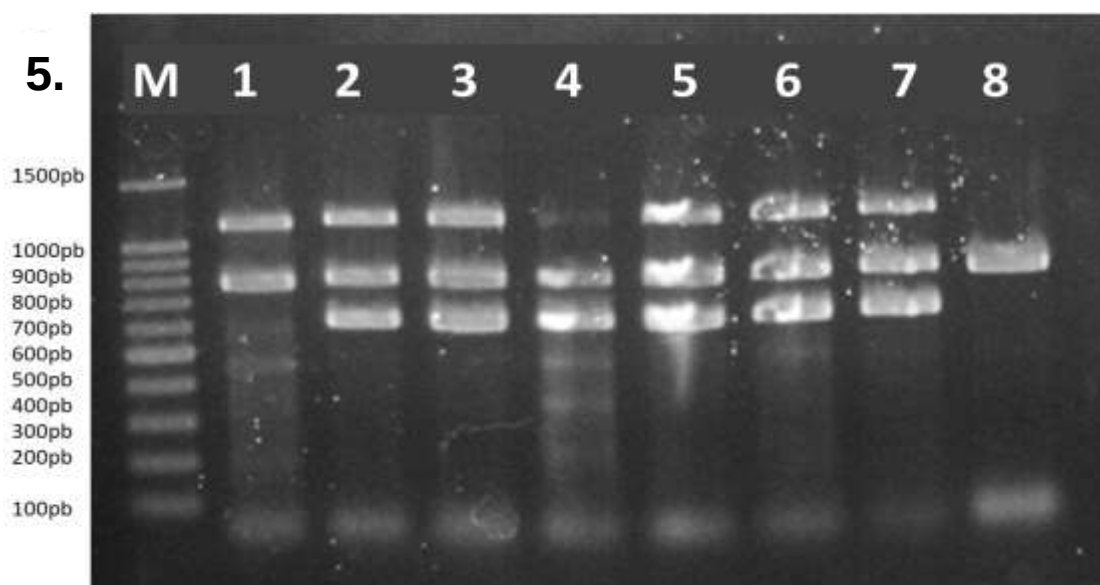
Figura 4 - Gel de agarose representativo do perfil de amplificação por multiplex PCR dos subsorotipos de *Shigella flexneri* com destaque para os perfis 5a, X e Y, pesquisados nesta nova etapa do estudo.



Nota: Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

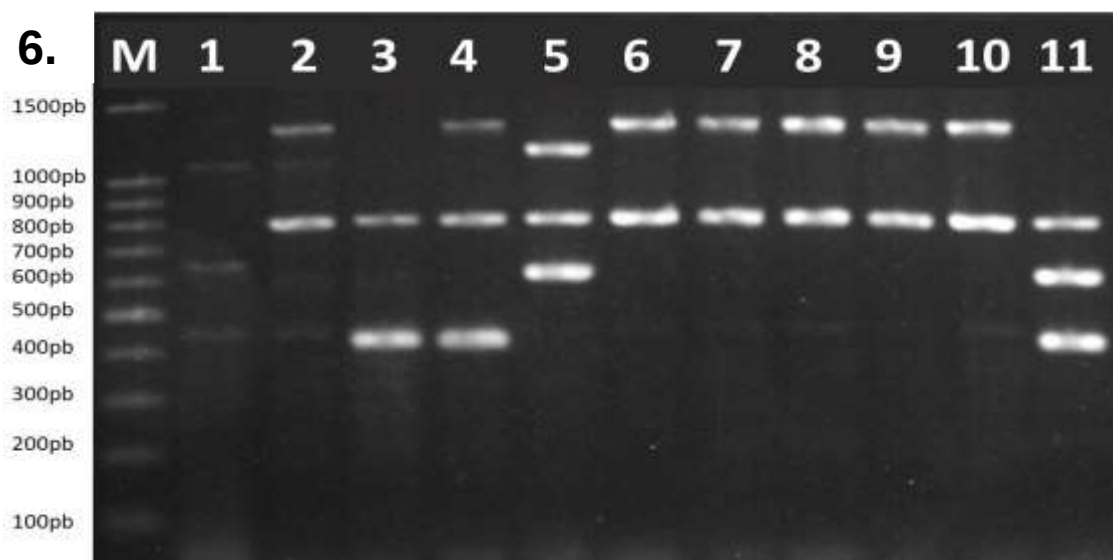
Foi realizado inicialmente por meio de multiplex PCR a sorotipagem molecular de 91 cepas de *Shigella flexneri* dos sorotipos de 1 a 4, que haviam sido determinados pela técnica de aglutinação em lâmina. Em resumo, obtivemos dentro do sorotipo 1, das 22 cepas testadas, 5 cepas que apresentaram o subsorotipo 1a, 13 cepas que apresentaram o subsorotipo 1b e 4 cepas que apresentaram perfis moleculares de outros sorotipos, divergindo do resultado da aglutinação. Nenhuma cepa dentro do sorotipo 1 apresentou perfil compatível com subsorotipo 1c (Figura 5). Dentro do sorotipo 2 foram testadas 25 cepas, das quais 17 foram classificadas por PCR como 2a, 2 como 2b e as demais 6 cepas apresentaram perfis de outros sorotipos (Figura 6). No sorotipo 3 foram testadas 25 cepas, das quais 6 foram classificadas como 3a e 12 cepas foram classificadas como 3b. Sete cepas apresentaram perfis moleculares de outros sorotipos (Figura 7). No sorotipo 4 foram testadas 19 cepas, sendo 4 classificadas como 4a, 2 como 4b, e as demais 13 cepas apresentaram perfis moleculares de outros sorotipos (Figura 8).

Figura 5 - PCR multiplex para o subsorotipos 1a e 1b.



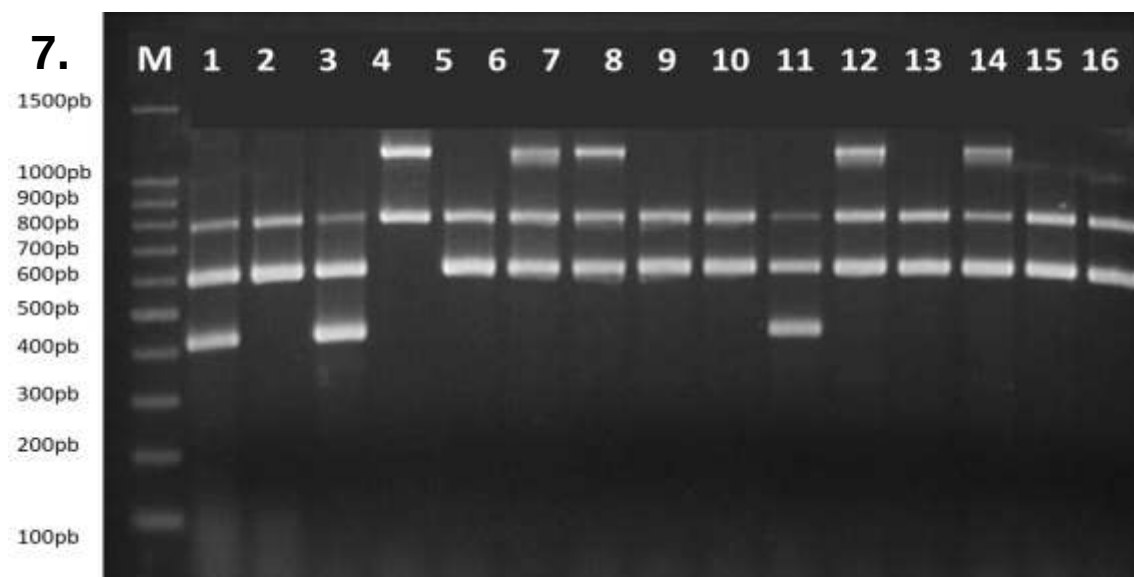
Nota: Esse gel em específico possui apenas 6 amostras representativas do experimento, as cepas de referência para 1a e 1b estão nas posições 1 e 2, respectivamente. Foram analisadas 22 amostras no total, desse total, 4 amostras obtiveram um perfil divergente ao esperado. Nenhuma amostra das 22, apresentou o perfil 1c. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

Figura 6 - PCR multiplex para o subsorotipos 2a e 2b.



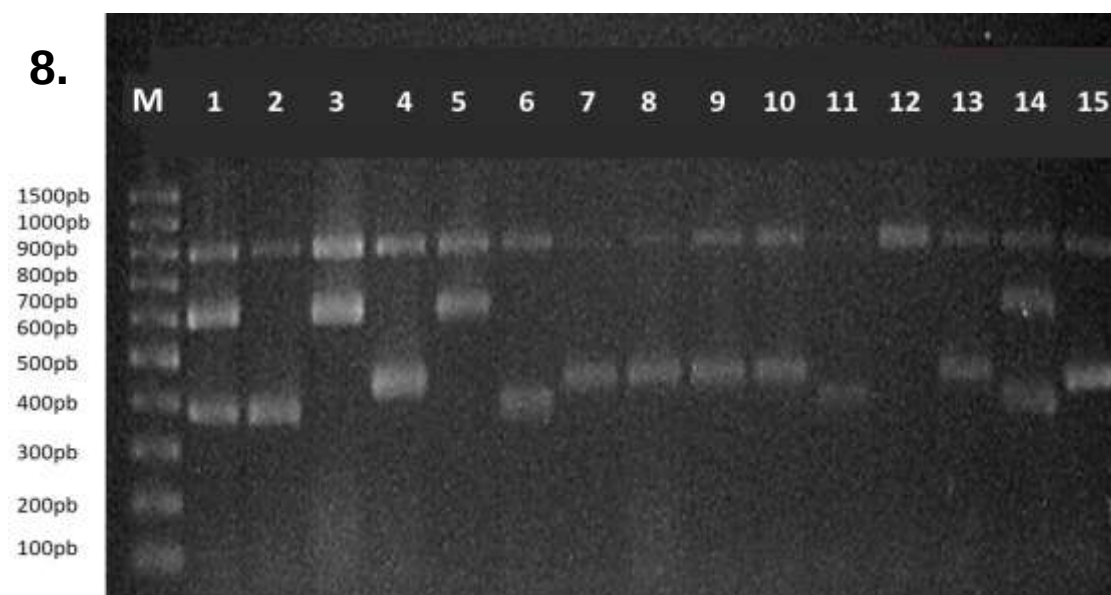
Nota: Esse gel em específico possui apenas 8 amostras representativas do experimento. Na posição 1 está o branco, e nas posições 2 e 4 as cepas de referência para 2a e 2b. Foram analisadas 25 amostras no total, desse total, 6 amostras obtiveram um perfil divergente ao esperado. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

Figura 7 - PCR multiplex para o subtipos 3a e 3b.



Nota: Esse gel em específico possui apenas 14 amostras representativas do experimento. Na posição 1 e 2 as cepas de referência para 3a e 3b, respectivamente. Foram testadas 25 amostras no total, desse total, 7 amostras obtiveram um perfil divergente ao esperado. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

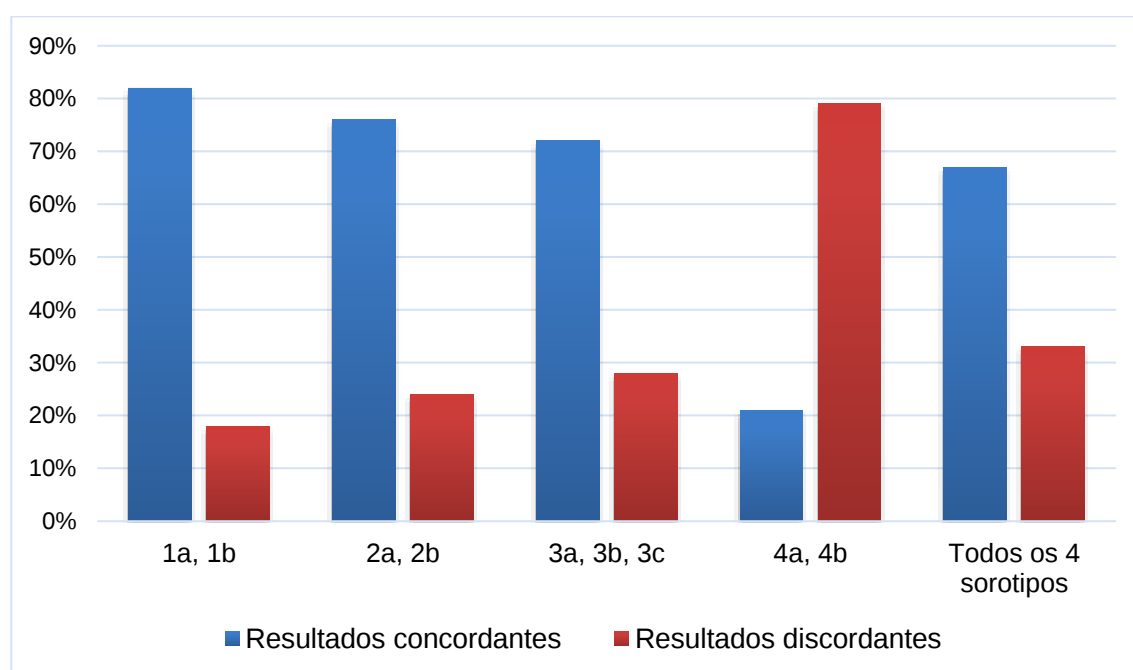
Figura 8 - PCR multiplex para o subtipos 4a e 4b.



Nota: Esse gel em específico possui apenas 13 amostras representativas do experimento. Na posição 1 e 2 estão as cepas de referência para 4a e 4b, respectivamente. Foram testadas 19 amostras no total, desse total, 13 amostras obtiveram um perfil divergente ao esperado. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

A análise de concordância foi utilizada para avaliar se os resultados iriam coincidir ou divergir, sendo aplicadas a técnica molecular e de aglutinação em lâmina. Sabendo-se que as amostras sorotipadas pela técnica de aglutinação tem um percentual de especificidade e sensibilidade menores que o multiplex PCR (MIOT, 2016). Ao compararmos o grau de concordância entre a técnica de aglutinação e o ensaio de multiplex PCR, observou-se nessa primeira etapa do estudo uma concordância de 67% entre os resultados dessas duas metodologias, sugerindo dessa forma que a aglutinação em lâmina possui especificidade menor quando comparada ao método molecular, já que 3% das cepas dos sorotipos 1 a 4 anteriormente sorotipadas por aglutinação não foram sorotipadas corretamente por PCR (Figura 9).

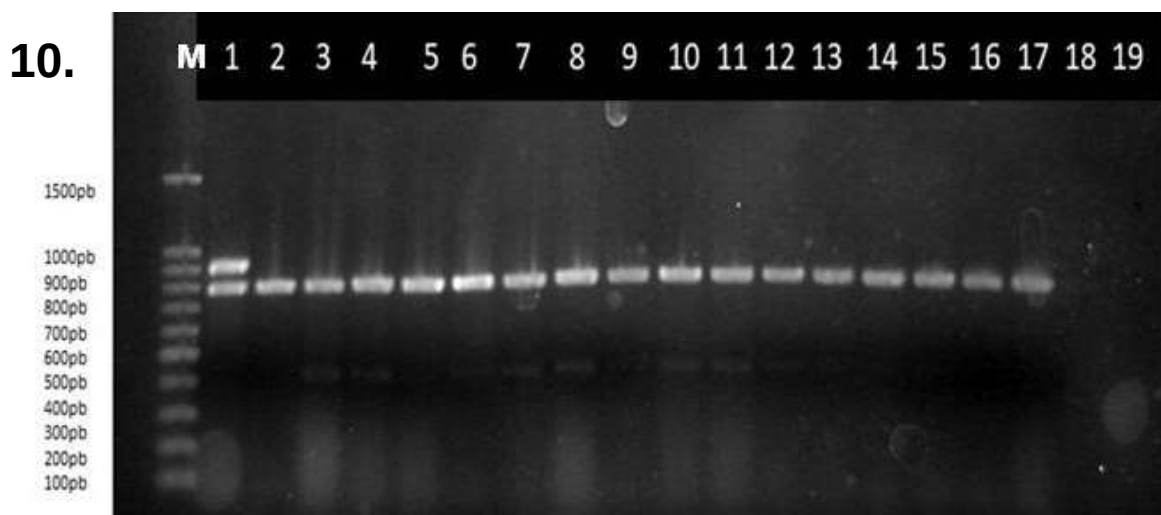
Figura 9 - Comparação entre os resultados obtidos no ensaio de aglutinação em lâmina com o obtido pelo multiplex PCR com as amostras da retina.



Na segunda etapa deste projeto as investigações prosseguiram com a aplicação do método de multiplex PCR para cepas dos sorotipos 5, X e Y. Além disso, produtos de amplificação provenientes dos genes que determinam a especificidade de cada subsorotipo (citados na tabela 1) foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para verificação da especificidade dos amplicons.

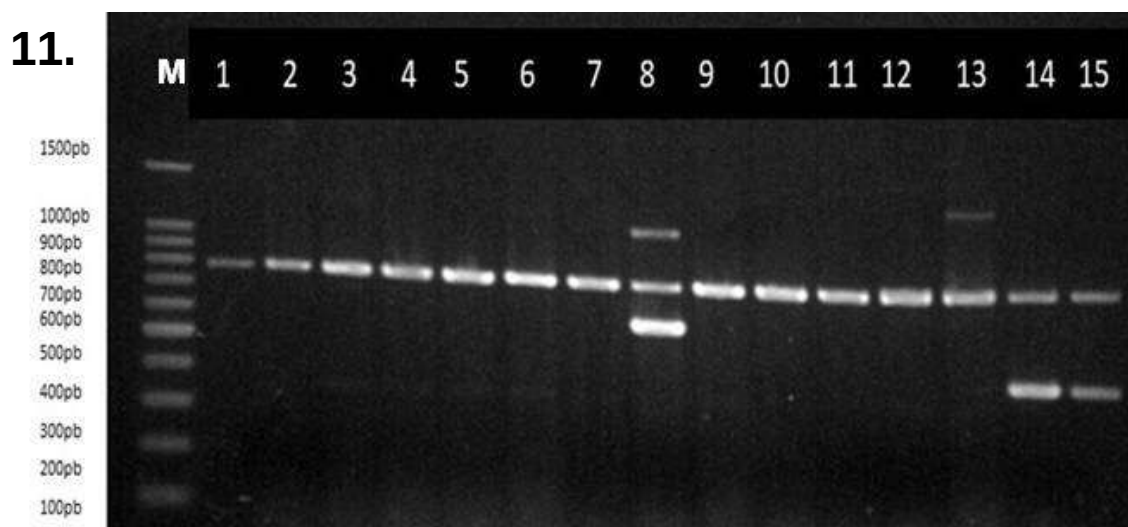
Foram obtidos os perfis esperados para os genes *gtrV* e *wzx* (subsorotipo 5a), *gtrX* e *wzx* (sorotipo X) e *wzx* (sorotipo Y) nas cepas de referência empregadas como controle para 5a, X e Y. A cepa de referência correspondente ao perfil 5b não apresentou os produtos de amplificação esperados, desse modo, esta cepa foi retirada das investigações posteriores. Após o teste com as cepas de referência, 38 amostras de *Shigella flexneri* de origem clínica previamente identificadas por aglutinação como pertencendo ao sorotipo 5 foram testadas por multiplex PCR. Apenas 4 dessas cepas apresentaram o perfil de amplificação esperado, ou seja, a presença dos genes *gtrV* e *wzx* que definem os subsorotipos 5a (Figura 10). Para o sorotipo Y, de um total de 13 cepas testadas, 11 foram compatíveis com a sorotipagem por aglutinação e 2 cepas apresentaram um resultado divergente (Figura 11). Já no sorotipo X, de um total de 22 cepas testadas, apenas 2 apresentaram um perfil compatível com a sorotipagem feita anteriormente (Figura 11).

Figura 10 - PCR multiplex para o subsorotipos 5a e 5b.



Nota: Esse gel em específico possui apenas 17 amostras representativas do experimento. Na posição 1 e 2 estão as cepas de referência para 5a e 5b, respectivamente. Foram testadas 38 amostras no total, desse total, 18 amostras obtiveram um perfil divergente ao esperado. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

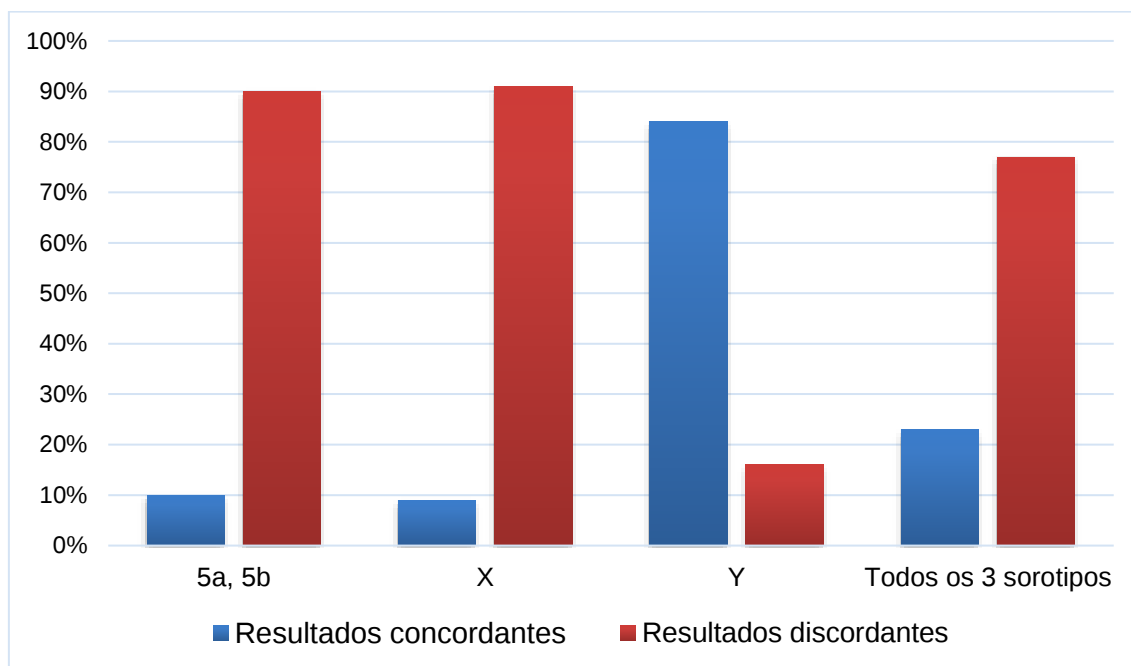
Figura 11 - PCR multiplex para os sorotipos Y e X.



Nota: Esse gel em específico possui apenas 13 amostras representativas do experimento. Na posição 1 o controle para o Y e na posição 1 e na posição 14 para o X. Foram testadas 13 amostras no total para o Y e 22 para o X, desse total, 2 amostras para o Y e 20 para o X, respectivamente, obtiveram um perfil divergente ao esperado. Legenda: M: Marcador de peso molecular (Sinapse Inc 100pb DNA ladder plus).

A figura 12 resume os resultados obtidos nesta nova etapa do estudo. A investigação de subsorotipos realizada em 73 cepas de *Shigella flexneri* identificadas anteriormente por aglutinação com os sorotipos de 5, X e Y, revelou que desse total, apenas 23% dos perfis foram totalmente concordantes com o PCR, ou seja, 77% das cepas testadas foram sorotipadas incorretamente pela técnica de aglutinação em lâmina. No total foram subsorotipadas 161 cepas, nas quais apenas 78 cepas (48,5%) apresentaram perfis totalmente concordantes com o PCR, resultando em uma porcentagem de 51,5% (83 cepas) sorotipadas incorretamente pela técnica de aglutinação em lâmina, demonstrando desse modo a sua baixa especificidade.

Figura 12 - Comparação entre os resultados obtidos no ensaio de aglutinação em lâmina com o obtido pelo multiplex PCR com as amostras da rotina.



Para verificação da especificidade dos produtos obtidos pela técnica de Multiplex PCR, os amplicons de cada um dos genes foram sequenciados pelo método de Sanger. Para a montagem de cada fita consenso e para a verificação de qualidade dos eletroferogramas obtidos após o sequenciamento de cada um dos genes associados aos distintos subsorotipos de *S. flexneri* foi utilizado o software *Electropherogram Quality Analysis* (PhPh) da EMBRAPA (Figura 13).

Figura 13 - Análise da qualidade dos eletroferogramas utilizando o software Eletropherogram Quality Analysis.

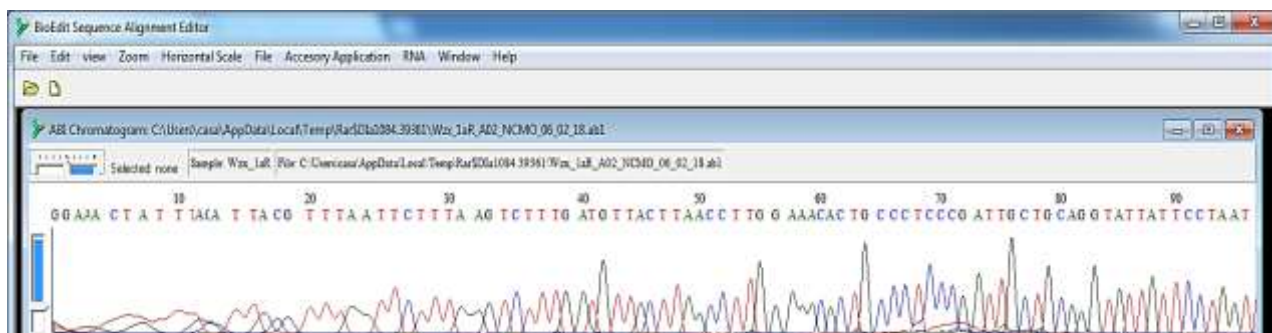
Number of Reads: 16						
	> 100 bases	> 200 bases	> 250 bases	> 300 bases	> 350 bases	> 400 bases
Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20	
☒ Wzx 1aF A01 NCMO 06 02 18.ab1	1013	308 (30%)	273 (27%)		Ok	
☒ Wzx 1aR A02 NCMO 06 02 18.ab1	901	597 (66%)	553 (61%)		Ok	
☒ Wzx 1bF B01 NCMO 06 02 18.ab1	1157	375 (32%)	306 (26%)		Ok	
☒ Wzx 1bR B02 NCMO 06 02 18.ab1	907	373 (41%)	320 (35%)		Ok	
☒ Wzx 2aF C01 NCMO 06 02 18.ab1	989	485 (49%)	447 (45%)		Ok	
☒ Wzx 2aR C02 NCMO 06 02 18.ab1	940	481 (51%)	406 (43%)		Ok	
☒ Wzx 2bF D01 NCMO 06 02 18.ab1	1252	405 (32%)	341 (27%)		Ok	
☒ Wzx 2bR D02 NCMO 06 02 18.ab1	931	495 (53%)	449 (48%)		Ok	
☒ Wzx 3aF E01 NCMO 06 02 18.ab1	909	490 (54%)	447 (49%)		Ok	
☒ Wzx 3aR E02 NCMO 06 02 18.ab1	926	559 (60%)	507 (55%)		Ok	
☒ Wzx 3bF F01 NCMO 06 02 18.ab1	931	537 (58%)	486 (52%)		Ok	
☒ Wzx 3bR F02 NCMO 06 02 18.ab1	1214	341 (28%)	283 (23%)		Ok	
☒ Wzx 4aF G01 NCMO 06 02 18.ab1	913	411 (45%)	371 (41%)		Ok	
☒ Wzx 4aR G02 NCMO 06 02 18.ab1	842	393 (47%)	336 (40%)		Ok	
☒ Wzx 4bF H01 NCMO 06 02 18.ab1	900	445 (49%)	392 (44%)		Ok	
☒ Wzx 4bR H02 NCMO 06 02 18.ab1	908	448 (49%)	408 (45%)		Ok	
Total	15633	7143 (46%)	6325 (40%)		No: 0	Ok: 16

Nota: Essa captura de tela demonstra a qualidade das bases encontradas no sequenciamento dos subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a e 4b para o gene *wzx*. Todas as amostras geraram uma fita consenso.

Obtivemos resultados não satisfatórios com os genes *gtrI* e *gtrX*, associados aos subtipos 1a, 1b, 2b, 3a, 5b e X, não sendo possível a formação da fita consenso devido à baixa qualidade das leituras obtidas. Devido a problemas posteriores no funcionamento do sequenciador não foi possível repetir essas amostras.

Para confirmação da qualidade das bases encontradas foi feita a verificação de cada eletroferograma logrado, utilizando um software de domínio público, *BioEdit 7.0.9*, sendo obtido em todas as amostras uma boa qualidade em seus picos, como no exemplo abaixo (Figura 14).

Figura 14 - Eletroferograma representativo do gene *wzx* da cepa de referência para o subsorotipo 1a.



Nota: O perfil dos eletroferogramas contidos na imagem demonstra uma boa qualidade da reação de sequenciamento. O mesmo padrão foi obtido nas demais cepas de referência cujos genes *oac*, *gtrII*, *gtrIV* e *gtrV* foram sequenciados.

Para a verificação do correto alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento realizado com as depositadas no *GenBank*® foi realizado um comparativo dos resultados obtidos com a sequência conhecida por intermédio do programa *ClustalW*. Uma imagem representativa desta análise é mostrada na Figura 15.

Figura 15 – Alinhamento representativo do produto obtido no sequenciamento do subtipo 1a com a sequência depositada no *GenBank*, por intermédio do programa *clustalW*.

```

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: Shigella          674 bp
Sequence 2: Sequenciamento   657 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 98.9346
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 1 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences: 2      Score:12427
Alignment Score 4128

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

```

```

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Shigella          TCATGAAAGAACCAAGGTAATTTCAACAAGTACATCTTTTTGGTGCTATTTTCATGCTT
Sequenciamento   TCATGAAAGAACCAAGGTAATTTCAACAAGTACATCTTTTTGGTGCTATTTTCATGCTT
*****

Shigella          TGGTGCTTTTTTATTATTGATTTCTCTGATGGAATTGTTAATTATCTAAAAATTTCTGG
Sequenciamento   TGGTGCTTTTTTATTATTGATTTCTCTGATGGAATTGTTAATTATCTAAAAATTTCTGG
*****

Shigella          TGTTGAACATAGTGATATACAACCTAGCATTAACTGTTGGCTATTTGCATTCCATTATT
Sequenciamento   TGTTGAACATAGTGATATACAACCTAGCATTAACTGTTGGCTATTTGCATTCCATTATT
*****

Shigella          TATTCTAAATCAATTATGGTCAGCCATTCTTGAGGGGGATGAAAAATTTGGCATTGTAAA
Sequenciamento   TATTCTAAATCAATTATGGTCAGCCATTCTTGAGGGGGATGAAAAATTTGGCATTGTAAA
*****

```

Nota: O alinhamento apresentado na imagem demonstra um bom score, representando assim um anelamento correto, na região de interesse, dos primers utilizados no projeto para subtipagem de *S. flexneri*.

5. DISCUSSÃO

Este projeto teve por objetivo avaliar um ensaio de multiplex PCR para a subsorotipagem molecular de cepas de *Shigella flexneri*. Foram testados genes considerados sorotipo/subsorotipos específicos, e em função destes genes representarem diferentes alvos, o formato de reação multiplex foi escolhido pela conveniência em relação ao menor tempo de execução e otimização no uso de insumos, uma vez que neste formato com apenas uma única reação todos os alvos podem ser pesquisados ao mesmo tempo. Os alvos genéticos foram pesquisados em reações individuais de PCR.

Inicialmente foram testados por esta metodologia genes associados aos subsorotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a e 4b com resultados satisfatórios para os sorotipos 1, 2 e 3, para os quais obteve-se uma concordância de cerca de 70% entre as técnicas de PCR multiplex e aglutinação em lâmina. No sorotipo 4 houve uma discordância de 79% entre as metodologias. Verificamos por meio do multiplex PCR que o subsorotipo 2a é o mais prevalente de *Shigella flexneri* no Estado de São Paulo, considerando a coleção de amostras presentes no Instituto Adolfo Lutz. Segundo LIU et al (2018) e FAN et al (2017), a prevalência deste subsorotipo é um achado comum frequentemente relatado em outras regiões do mundo. Já no Brasil, estudos como o de BASTOS et al (2012) e PEIRANO, SOUZA, RODRIGUES (2006) corroboram nosso achado uma vez que o subsorotipo 2a foi o mais prevalente relatado tanto no estado do Pará como no Brasil.

Na segunda etapa do projeto foram realizadas reações para verificação da eficácia de amplificação de genes-alvo para os sorotipos/subsorotipos 5a, 5b, X e Y. Observou-se que o perfil de amplificação desejado foi obtido para 5a, X e Y, porém não foi obtido para o subsorotipo 5b, do mesmo modo que foi observado por SUN et al (2013). Existe a possibilidade de que estas cepas previamente sorotipadas com a técnica de aglutinação em lâmina e que não apresentaram amplificação para alguns genes neste estudo, possam ter sofrido uma perda de material genético devido ao longo período de estocagem, uma vez que foram mantidas em estoques à temperatura ambiente, não sendo esta forma de manutenção a recomendada para longos períodos de estocagem pela

possibilidade de alterações genéticas irreversíveis como eliminações, inserções, e mutações em genes de modificação do antígeno O que possam acarretar em sua inativação. Considerando a hipótese de falha na estocagem das cepas, especialmente as cepas de referência, é necessário que haja o emprego de técnicas como o congelamento a -20°C/-70°C ou a liofilização, de modo a prevenir que alterações genéticas possam inviabilizar o uso do material para futuras análises. Outra possibilidade mais remota é que tais cepas que não apresentaram os resultados esperados possam ser portadoras de polimorfismos gênicos nas regiões de anelamento dos primers (VAN DER PLOEG, 2018).

Observamos que os subsorotipos/sorotipos avaliados apresentaram uma concordância de cerca de 23% entre as técnicas, entretanto ao analisarmos individualmente cada sorotipo esse percentual de concordância variou nessa etapa entre 9 a 44%. O sorotipo que apresentou uma maior concordância foi o Y. Já para o 5a e o X houve uma concordância muito baixa entre os dois métodos. O baixo percentual de concordância encontrado nesses sorotipos testados, alerta para o fato de que a aglutinação em lâmina, embora seja o método padrão-ouro, não se mostra como a melhor opção para caracterização desses respectivos sorotipos de *Shigella flexneri* devido a sua baixa especificidade.

Os produtos de PCR sequenciados provindos dos diversos subsorotipos testados apresentaram, no geral, identidade acima de 97% quando comparados a outras sequências de *Shigella flexneri* depositas no *Genbank*. Isto demonstra que os primers utilizados neste estudo possuem uma especificidade satisfatória. Devido ao equipamento de sequenciamento do Instituto Adolfo Lutz ter entrado em manutenção, não foi possível retestar dois genes que não apresentaram um bom resultado no sequenciamento, sendo estes *gtrI* e *gtrX*.

A técnica de PCR multiplex ainda não é utilizada para sorotipagem/subsorotipagem de *Shigella flexneri* no Brasil, embora no país o método de multiplex PCR seja amplamente empregado para outros tipos de caracterização molecular de patógenos. Segundo estudos recentes (VAN DER PLOEG, 2018), utilizando também o método de SUN et al. (2011), foi possível por meio de multiplex PCR subsorotipar cepas de *Shigella flexneri*, observando-se resultados com uma alta especificidade e eficiência.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, a técnica de aglutinação necessita de até 10 reações separadas para identificar o sorotipo de um isolado. Requer a utilização de animais para obtenção dos soros, apresenta reações cruzadas frequentes entre os sorotipos e a técnica exige um profissional experiente para sua realização e interpretação dos resultados. Por outro lado, o método molecular multiplex PCR possibilita uma rápida e única reação, além de apresentar uma maior confiabilidade nos resultados pois demonstra uma maior especificidade para caracterização antigênica de *Shigella flexneri*.

Por meio deste estudo foi possível observar que o subsorotipo 2a é o mais prevalente dentre as cepas de *Shigella flexneri* isoladas de infecções humanas em diferentes períodos no Estado de São Paulo. Os resultados obtidos geraram dados epidemiológicos importantes para compreensão da epidemiologia da Shigelose e para outras finalidades como, por exemplo, dar subsídio para o desenvolvimento de uma possível vacina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

BARRY, Eileen M. et al. Progress and pitfalls in Shigella vaccine research. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 245, 2013.

BASTOS, F.C., LOUREIRO, E.C.B., HOFER, E. Frequency of *Shigella flexneri* serotypes isolated in the state of Pará, Brazil (1979-2009). **Rev.Patol.Trop.**, v.41, p.277-284, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Shigella Surveillance Annual Report 2014**, Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.

COSTA, Ana Roberta Fusco da et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreogênicas. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 77-84, jun. 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 10 mar. 2018.

DA CUNHA, Fernanda de Paula Longo et al. Shigella sp: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, 2017.

EWING, W.H. Edward's and Ewing Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed., **Elsevier Science Publishing Co.**, 1986.

FAN, Wenting et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. **Gut pathogens**, v. 9, n. 1, p. 76, 2017.

FARFÁN, M. J. et al. A new multiplex PCR for differential identification of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* and detection of *Shigella* virulence determinants. **Epidemiology & Infection**, v. 138, n. 4, p. 525-533, 2010.

FOCCACIA, R., VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 10^a ed., Atheneu, 2010.

GENTLE, AMY et al. Evaluation of molecular methods for serotyping *Shigella flexneri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1456-1461, 2016.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

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

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBER, E.A. **Microbiologia Médica**. 2a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

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

LIU, Hongbo et al. Dominant serotype distribution and antimicrobial resistance profile of *Shigella* spp. in Xinjiang, China. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195259, 2018.

LIVIO, S. et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. **Clin.Infect. Dis.**, v.59, p.933-41, 2014.

Ministério da Saúde, BRASIL. Principais Síndromes Infeciosas, 2009.

Miot, H. A.. Análise de concordância em estudos clínicos e experimentais. **J. vasc. bras**, v. 15, n. 2, p. 89-92, 2016.

Murray, P. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed., American Society for Microbiology, 2007.

OJHA, S.C. et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **Biom.Res.Intern.**, v. 2013, Article ID 412370, doi:10.1155/2013/412370, 2013.

PEIRANO, Gisele; SOUZA, Flávia dos Santos; RODRIGUES, Dalia dos Prazeres. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 245-250, Maio 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000300003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 18 jul. 2018.

SANSONETTI, Philippe J. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 3, p. G319-G323, 2001.

SERIBELLI, Amanda Aparecida. **Análise do potencial patogênico, diversidade genotípica e perfil de resistência de linhagens de *Shigella sonnei* isoladas de 1983 a 2014 no Estado de São Paulo**. 2016. 40f. Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SIMMONS, D.A.R., ROMANOWSKA, E. Structure and biology of *Shigella flexneri* O antigens. **J.Med.Microbiol.**, v.23, p.289-302, 1987.

SUN, Q., et al. Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri*. **J.Clin.Microbiol.**, v.49, p.3766-3770, 2011.

TAKAGI, Elizabeth Harummy. **Caracterização molecular e fenotípica de amostras bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii***. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

THIEM, Vu Dinh 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.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. Microbiologia, 5ª edição, 2008. **São Paulo: Atheneu**, cap. 42, p. 321-327, 2008.

VAN DE VERG, L.L., VENKATESAN, M.M. A *Shigella* vaccine against prevalent serotypes. *Clin.Infect.Dis.*, v.59, p.942-943, 2014. Von Seidlen, L. et al. A multicenter study of *Shigella* diarrhea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. **PLoS Med.**, 3: e353, 2006.

VAN DER PLOEG, Claudia A. et al. Design of Two Multiplex PCR Assays for Serotyping *Shigella flexneri*. **Foodborne pathogens and disease**, 2018.

VON SEIDLEN, L. et al. A multicenter study of *Shigella* diarrhea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. **PLoS Med.**, 3: e353, 2006.

Von Seidlen, L. et al. A multicenter study of *Shigella* diarrhea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. **PLoS Med.**, 3: e353, 2006.

ZHAO, Lifeng et al. An 11-year study of shigellosis and *Shigella* species in Taiyuan, China: Active surveillance, epidemic characteristics, and molecular serotyping. **Journal of Infection and Public Health**, 2017.