

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Cheila Minéia Daniel de Paula
(Engenheira de Alimentos - UFRGS)

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SHIGELLA* SPP.
ENVOLVIDAS EM SURTOS ALIMENTARES OCORRIDOS NO RIO GRANDE DO
SUL**

Porto Alegre
Fevereiro 2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Cheila Minéia Daniel de Paula
(Engenheira de Alimentos - UFRGS)

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SHIGELLA* SPP.
ENVOLVIDAS EM SURTOS ALIMENTARES OCORRIDOS NO RIO GRANDE DO
SUL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Porto Alegre
Fevereiro 2009

Cheila Minéia Daniel de Paula
(Engenheira de Alimentos - UFRGS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:
Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

JOSÉ MARIA WIEST
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA
CARDOSO
Banca – Veterinária
Preventiva/UFRGS

ADRIANO BRANDELLI
Banca – PPGCTA/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

BERNADETTE DORA GOMBOSSY
DE MELO FRANCO
Banca – USP/SP

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Eduardo Tondo, por acreditar em mim e por me estimular a ir sempre um pouco além do que acredito ser possível. Agradeço também pela amizade e pela compreensão nesses quase dez anos em que tem sido meu orientador.

À Mercedes P. Geimba pela ajuda, pela amizade e principalmente por ter partido dela a idéia do trabalho com *Shigella* e a parceria com o FEPPS/IPB/LACEN/RS, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À direção do FEPPS/IPB/LACEN/RS, aos setores de Bacteriologia e de Microbiologia de Alimentos e pela doação das amostras. Em especial agradeço as amigas Silvia da Bacteriologia, e Jane e Solange do setor de alimentos.

A Capes pela bolsa de estudos e a FAPERGS pela bolsa de Iniciação Científica, para a realização deste trabalho.

À minha bolsista de Iniciação científica, hoje grande amiga, Patrícia Heidrich do Amaral pela amizade, dedicação e pelo entusiasmo a cada resultado positivo e principalmente por nunca ter desanimado quando alguma coisa saia errada.

À Júlia Teixeira, a “*peste*” mais querida que cruzou meu caminho, pelo carinho, pela amizade e acima de tudo por sua sinceridade.

À Ana Carolina pela amizade sincera e por tornar sempre o meu dia mais feliz com seu jeito moleca de ser e também pela imensa ajuda durante a elaboração deste trabalho, sem esta certamente teria sido bem mais difícil.

As amigas Patrícia e Roberta, pela amizade, pelo cansaço, mas também por muitas risadas a bordo do “*expresso tartaruga*”.

À Josete pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelo “excesso de bagagem” *gracias*.

À Sabrina por me ensinar que não é preciso esperar um momento especial para saborear um bom espumante, porque um bom espumante torna qualquer momento especial.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelo empréstimo dos equipamentos e pela troca de experiência.

Em especial aos grandes amores da minha vida, meus pais Mauro e Ainda Regina pela dedicação, pelo exemplo de honestidade e por terem feito de mim o ser humano que sou hoje; ao Fernando, pelo apoio incondicional, por estar sempre ao meu lado, por seu amor, carinho, dedicação e aos três pela companhia em muitas idas ao campus do vale em pleno fim de semana.

À Marina por todas as vezes que disse: dinda eu te amo.

Aos professores do PPGCTA, e a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Isolamento, identificação e caracterização de *Shigella* spp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul

Autor: Cheila Minéia Daniel de Paula

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

RESUMO

No Brasil existem poucos relatos sobre casos de Shigelose, um fator que contribui com o pouco conhecimento a respeito dessa doença. Além disso, a falta de obrigatoriedade por parte da legislação vigente em relação à pesquisa de *Shigella* tem contribuído com este fato. O presente trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar isolados de *Shigella* envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul, além de comparar tais isolados de alimentos com amostras isoladas de fezes de pacientes com diarreia envolvidos nesses surtos. Após a identificação, os isolados foram submetidos à caracterização por suscetibilidade a antimicrobianos e PCR-Ribotipificação. Entre agosto de 2007 e agosto de 2008, foram isoladas três linhagens de *Shigella* (2 *S. flexneri* e 1 *S. sonnei*) a partir de placas de meio de cultura utilizadas pela FEPPS/LACEN/RS para pesquisa de *Salmonella* em alimentos suspeitos. Uma vez que a análise foi considerada negativa para a presença *Salmonella*, o resultado nas estatísticas epidemiológicas do RS possivelmente foi expresso como “agente do surto não identificado”. Das 149 linhagens de *Shigella* isoladas pelo mesmo órgão, entre 2003 e 2007, 71,14 % foram identificados como *S. flexneri*, 21,48% como *S. sonnei*, 0,67% como *S. dysenteriae* e 6,71% foram classificados apenas como *Shigella* sp. Os resultados também demonstraram um aumento no percentual de isolados de *S. sonnei*, que em 2003 era nulo e em 2007 foi de 43,48 %, ao mesmo tempo o percentual de isolados de *S. flexneri* passou de 100% em 2003 para 47,83% em 2007. Em relação ao teste de resistência a antimicrobianos os isolados provenientes de fezes (n=149) demonstraram altas percentagens de resistência, sendo que as maiores foram observadas contra estreptomicina (88,59%), ampicilina (84,56%) e sulfametoxazol-trimetoprim (80,53%). Os maiores percentuais de sensibilidade foram para ciprofloxacina (96,64%), ácido nalidíxico (89,26%) e gentamicina (83,22 %). A resistência múltipla foi verificada em 90,19% dos isolados. Dos 73 perfis de resistência encontrados, 82,23 % apresentaram resistência a pelo menos três antimicrobianos. Seis perfis agruparam mais de quatro isolados (A, B, C, D, E e F). O mais resistente dos isolados de alimentos apresentou resistência à gentamicina e resistência intermediária à tetraciclina e ao cloranfenicol. Quando os isolados de *Shigella* foram submetidos à PCR-Ribotipificação, somente três perfis (SH1, SH2 e SH3) foram identificados. O perfil SH1 agrupou 76,31% dos isolados (todos *S. flexneri*) e o perfil SH2 agrupou 23% dos isolados (todos *S. sonnei*). De acordo com os resultados, várias linhagens de *Shigella* apresentaram o mesmo padrão de bandas na PCR-Ribotipificação e também o mesmo perfil de resistência, sugerindo tratar-se da mesma linhagem de *Shigella*; Os resultados obtidos no presente estudo indicam a necessidade do monitoramento contínuo da resistência da *Shigella* e também que a PCR-Ribotipificação pode ser útil na investigação de surtos de Shigeloses alimentares.

Palavras - chave: *Shigella*, Shigelose, antimicrobianos, PCR-Ribotipificação

Isolation, identification, and characterization of *Shigella* spp. associated with foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul State, Brazil

Author: Cheila Minéia Daniel de Paula

Advisor: Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT

In Brazil, there are few reports about foodborne Shigellosis and the Brazilian regulation do not require compulsory investigation for *Shigella* in foods, contributing to the lack of knowledge about this disease. The objective of the present study was to isolate, identify and characterize isolates of *Shigella* involved in outbreaks occurred in Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, and compare the strains isolated from foods with those isolated from fecal stools of foodborne shigellosis victims. Food isolates were sampled between August 2007 and August 2008 from plates of selective medium used for *Salmonella* detection in suspect foods analysed by official Laboratory of RS (FEPPS/LACEN/RS), while fecal isolates were isolated from victim stools analysed between 2003 and 2007 by the same Laboratory. Bacterial samples were identified by FEPPS/LACEN/RS and submitted to antimicrobial susceptibility testing and PCR-Ribotyping. Results indicated that three *Shigella* (1 *S. sonnei* and 2 *S. flexneri*) were isolated from foods and 149 were isolated from fecal stools (71.14 % *S. flexneri*, 21.48 % *S. sonnei*, 0.67 % *S. dysenteriae*, and 6.71 % *Shigella* sp.). Results also showed an increase on the isolation percentage of *S. sonnei* from fecal samples, which was zero in 2003 increasing to 43.48 % in 2007. At the same period, the percentage of isolation of *S. flexneri* decreased from 100 % in 2003 to 47.83 % in 2007. Fecal stool isolates demonstrated high percentages of resistance, mainly for streptomycin (88.59 %), ampicillin (84.56 %) and sulfamethoxazole-trimethoprim (80.53 %). The highest percentage of sensitivity was observed for ciprofloxacin (96.64 %), nalidixic acid (89.26%) and gentamicin (83.22 %). Multiple resistance was observed in 137 isolates (90.19 %). Experiments revealed that 73 resistance patterns were found, and 82.23 % of the isolates showed resistance to at least three drugs. Six patterns grouped more than four isolates (A, B, C, D, E, and F). The most resistant isolates from foods showed only resistance to gentamicin and intermediate resistance to tetracycline and to chloramphenicol. PCR-Ribotyping identified three banding patterns (SH1, SH2, and SH3). The profile SH1 grouped 76.31 % of the isolates (all *S. Flexneri*) and profile SH2 grouped 23 % of isolates (all *S. sonnei*). According to the results, various *Shigella* isolates showed the same PCR-Ribotyping banding patterns and also the same resistance profile, suggesting it is the same strain of *Shigella*. The results indicate the need for continuous monitoring of resistance of *Shigella* and that the PCR-Ribotyping could be useful in the investigation of foodborne Shigellosis.

Keywords: *Shigella*, Shigelose, antibiotics, PCR-Ribotyping

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: ampicillin
ANSORP: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens
ATCC: American Type Culture Collection
BAM: Bacteriological Analytical Manual
BHI: Brain Heart Infusion
C: chloramphenicol
CDC: Centers for Disease Control and Preventions
CIP: ciprofloxacin
CMMEF: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
S: streptomycin
FDA: Food and Drugs Administration
FEPPS/LACEN/RS: Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul
FoodNet: Foodborne Diseases Active Surveillance Network
GEN: gentamicin
ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IOC/FIOCRUZ: Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
LIA: Lysine Iron agar
K: Kanamycin
NAL: nalidixic acid
NARMS: National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria
NRLCED: National Reference Laboratory for Cholera and Enteric Diseases
OMS: Organização Mundial da Saúde
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PCR: Polymerase Chain Reaction
RJ: Rio de Janeiro
RS: Rio Grande do Sul
SS: *Salmonella Shigella* agar
SXT: sulfamethoxazole/trimethoprima
T: tetracycline
TSI: Triple Sugar Iron agar,
UFC: Unidade Formadora de Colônias
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
XLD: Xylose lysine deoxycholate agar
WHO: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

- TABLE 1.** Etiologic agent of Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, during the period of 2003 to 2007.....47
- TABLE 2.** Distribution of cases of foodborne Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul between 2003 to 2007 according to age, gender and species of *Shigella*.....48
- TABLE 3.** General percentages of antimicrobial resistance among *Shigella* spp. isolated from fecal stools associated with foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, during the years 2003 and 2007.49
- TABLE 4.** Most expressive antimicrobial resistance pattern of *Shigella* isolated from fecal stool samples and from foods associated with foodborne Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul, Brazil.....50
- FIGURE 1.** PCR-Ribotyping profiles of *Shigella* isolated from foodborne Shigellosis of Rio Grande do Sul State, Brazil. **M** Ladder (1kp by Invitrogen), **1** *S. Dysenteriae* (profile SH3), **2** *S. flexneri* (profile SH1), **3** *S. sonnei* (profile SH2), **4** *Salmonella* Enteritidis (3091/05), **5** Negative Control, and **M** Ladder (1kp by Invitrogen).....51

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVO GERAL	12
1.2.1 Objetivos específicos	12
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.3.1 Características gerais da <i>Shigella</i> e Shigelose	13
1.3.2 Mecanismos de virulência	14
1.3.4 Shigelose no mundo	15
1.3.5 Caracterização fenotípica por resistência a antimicrobianos	16
1.3.6 Resistência a antimicrobianos em <i>Shigella</i>	16
1.3.7 Caracterização genotípica de microrganismos	18
<i>1.3.7.1 Caracterização por PCR- ribotipificação</i>	18
CAPÍTULO 2	20
2.1 RESULTADOS	21
2.1.1 Artigo 1 Antimicrobial Resistance and PCR-Ribotyping of <i>Shigella</i> responsible for foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil	21
CAPÍTULO 3	52
3.1 DISCUSSÃO GERAL	53
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas por microrganismos ou suas toxinas, após a ingestão de água ou alimentos contaminados. É sabido que representam um sério problema de saúde pública, além de acarretar em expressivos gastos monetários (AMSON, G. V., et al., 2006). Muitos casos de DTA não são notificados, uma vez que seus sintomas são, muitas vezes, confundidos com gripes ou se apresentam como discretas diarréias e vômitos, prejudicando o seu estudo.

Outro fator que contribui para o pouco conhecimento a respeito de algumas DTA é a falta de obrigatoriedade de pesquisa por parte da legislação, como ocorre com o gênero *Shigella*. As disenterias causadas por *Shigella* constituem um importante problema de saúde em países industrializados e em desenvolvimento. No Brasil, existem poucos relatos de Shigeloses, o que talvez possa ser atribuído ao fato de que nenhuma legislação vigente solicite a pesquisa de *Shigella* em água ou alimentos. Ainda assim, segundo dados do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (FEPPS/LACEN/RS), esse microrganismo tem sido freqüentemente isolado a partir de fezes de pacientes com diarréia no Rio Grande do Sul (RS). Adicionado a isso, é sabido que a *Shigella* apresenta características fenotípicas muito semelhantes a *Salmonella* (HAIMOVICH; VENKATESAN, 2006), a qual é o principal agente causador de DTA no RS (OLIVEIRA, F. A., et al., 2008). Tal semelhança pode possibilitar que surtos causados por *Shigella* sejam atribuídos à *Salmonella*.

Em vista disso, a caracterização de isolados de *Shigella* envolvidos em surtos alimentares ocorridos no RS pode contribuir com o conhecimento e prevenção de novos surtos causados por esse microrganismo.

1.2 OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar e caracterizar isolados de *Shigella* envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul.

1.2.1 Objetivos específicos

- Isolar e identificar as espécies de *Shigella* envolvidos nos surtos alimentares investigados pela Vigilância Sanitária do RS.
- Diferenciar as cepas de *Shigella* através de suscetibilidade a antimicrobianos e PCR-Ribotipificação.
- Investigar a ocorrência de cepas semelhantes causando diferentes surtos alimentares.
- Comparar as cepas de *Shigella* isoladas de alimentos com aquelas isoladas de fezes de acometidos por Shigelose.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características gerais da *Shigella* e Shigelose

As bactérias do gênero *Shigella* são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, assim como a *Salmonella* e a *Escherichia*. São bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, imóveis, aeróbios facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido, geralmente sem gás, não possuem cápsula, exceto certos sorovares de *S. flexneri* e *S. boydii*, não hidrolisam uréia, não produzem gás sulfídrico, não descarboxilam a lisina e, além disso, não utilizam citrato nem acetato de sódio como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2005; PENATTI, M.P.A., et al., 2007). *Shigella* spp. é filogeneticamente relacionadas tanto com *Salmonella* quanto com *Escherichia* (JAY, 2005; HAIMOVICH; VENKATESAN, 2006).

O gênero *Shigella* inclui quatro espécies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. sonnei* (FRANCO; LANDGRAF, 2005). As três primeiras espécies incluem vários sorovares. *S. sonnei* e *S. boydii* geralmente estão relacionadas com as enfermidades mais brandas, podendo ocorrer diarreia aquosa e com sangue. *S. flexneri* é a principal causa de Shigelose endêmica em países em desenvolvimento (WHO, 2005).

As três espécies que agem como agentes etiológicos de gastroenterites de origem alimentar são classificadas em grupos sorológicos com base nos antígenos O: *S. flexneri* no grupo B, *S. boydii* no grupo C e *S. sonnei* no grupo D. *S. dysenteriae* é o principal patógeno causador da disenteria bacilar clássica; sendo que aproximadamente 10UFC são suficientes para iniciar uma infecção em indivíduos susceptíveis (FDA, 2001, FRANCO; LANDGRAF, 2005). Embora, esta síndrome possa ser contraída pela ingestão de alimentos, esse microrganismo não é considerado um causador de infecção alimentar do mesmo modo como as outras três espécies (JAY, 2005). De acordo com Navia e Gascoín (2005), devido a sua baixa dose infectante, a Shigelose pode ser considerada uma doença contagiosa e, na maioria das vezes, os casos ou surtos de Shigelose se dão devido à propagação clonal de uma ou poucas cepas.

Ao contrário de *Salmonella* e *Escherichia*, *Shigella* não apresenta reservatórios animais que não sejam os humanos (JAY, 2005) e apenas em alguns

casos excepcionais, primatas superiores como o chimpanzé e os gorilas podem ser considerados hospedeiros acidentais (RIBEIRO, 2000).

As espécies de *Shigella* apresentam características típicas de bactérias entéricas. Crescem em temperaturas entre 10° C e 48° C e pH ideal de 6 a 8, embora crescimento em pH 5,0 já tenha sido descrito. Ainda não está claro como estes microrganismos podem se multiplicar em valores de a_w mais baixos que aqueles exigidos por *Salmonella* e *Escherichia*. Sua resistência ao calor é semelhante àquela expressada por cepas de *E. coli* (JAY, 2005).

A *Shigella* é freqüentemente disseminada através do contato direta pessoa-pessoa por transmissão fecal-oral ou indiretamente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados (FLÓREZ, A. J., et al. 2005).

A contaminação dos alimentos por *Shigella*, geralmente, se dá através de manipuladores de alimentos infectados e com higiene pessoal inadequada. *Shigella* é resistente a ácidos, tolerante a níveis elevados de sais, pode sobreviver em frutas, vegetais e demais alimentos com pH reduzido, alimentos preparados e alimentos embalados em atmosfera modificada ou a vácuo (WARREN; PARISH; SCHNEIDER, 2006).

1.3.2 Mecanismos de virulência

Após a ingestão de alimentos ou água contaminados por *Shigella*, o microrganismo alcança o cólon e o reto, ocorrendo a passagem da barreira epitelial do intestino pela invasão das células M. Em seguida, *Shigella* é fagocitada por macrófagos, provoca apoptose destas células, atinge o pólo basolateral das células epiteliais e as invade. *Shigella* consegue mover-se de uma célula a outra através da formação de protrusões de actina. Os macrófagos que sofreram apoptose e as células epiteliais invadidas liberam interleucinas IL-1 e IL-8, respectivamente, as quais promovem o recrutamento de monócitos através da barreira epitelial, facilitando a entrada de bactérias do lúmen, aumentando a invasão do epitélio. O resultado da infecção é uma resposta inflamatória aguda, acompanhada de disenteria. Este tipo de dano provoca perda de sangue e muco no lúmen intestinal. Uma vez que a absorção de água no cólon é inibida, o resultado é a produção de fezes com pouco volume. A Shigelose também pode provocar diarreia aquosa. Das

espécies de *Shigella*, *S. sonnei* causa diarreia com mais frequência (JAY, 2005; PARSOT, 2005; HAIMOVICH; VENKATESAN, 2006).

1.3.4 Shigelose no mundo

Shigella é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos principais problemas mundiais de saúde pública. Está entre as principais causas de diarreia em pacientes pediátricos, em países em desenvolvimento, porém também é responsável por diarreia em crianças de países industrializados, principalmente em ambientes como creches e pré-escolas. Com relação à infecção intestinal, o risco de contrair uma Shigelose está associado com a falta de saneamento básico e/ou de higiene pessoal (FULLÁ, N., et al., 2005, SAVADKOOHI; KACHO, 2007; PENATTI, M.P.A., et al., 2007).

Surtos de origem alimentar por *Shigella* são geralmente associados com alimentos que foram submetidos à preparação manual e servidos crus ou mal cozidos (WU, F. M. et al., 2000).

Mead et al. (1999) estimaram que *Shigella* foi responsável por aproximadamente 500.000 casos de DTA, causando cerca de 6.231 hospitalizações e 70 mortes nos Estados Unidos, anualmente. Em 2004, *Shigella*, ficou em terceiro lugar entre os patógenos de origem alimentar, segundo o Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) do Centers for Disease Control and Preventions (CDC, 2005). No ano de 2000, dentre os casos de Shigelose, confirmados em laboratório e reportados ao CDC, mais de 80% foram causados por *S. sonnei* (CDC, 2003).

No Japão, foram relatados de 1000-1600 casos de Shigelose, anualmente. Das espécies isoladas, *S. sonnei* foi a que apresentou maior aumento na frequência de isolamento. Os sintomas da Shigelose causada por *S. sonnei* são, geralmente, mais brandos em adultos, sendo que, somente alguns desenvolvem a doença, enquanto outros são considerados portadores assintomáticos (MIYAGI, K., et al., 2001).

Em 2004, foi relatado um surto de Shigelose em uma escola de Madri, Espanha. A escola tinha cerca de 520 estudantes, destes, 60 adoeceram e 28 familiares também tiveram a doença. O caso inicial foi uma menina três anos e o

surto durou dois meses provavelmente, devido à detecção tardia do agente etiológico (JONSSON, J., et al., 2005).

No Chile, de 1997 a 2001, dentre 4.080 casos agudos de diarreia em crianças com menos de cinco anos, *Shigella* foi identificada em 178 destes (FULLÁ, N., et al., 2005).

No Brasil, durante o período de 1999 a 2004, 296 isolados de *Shigella* foram reportados pelo Instituto Osvaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. As espécies isoladas com maior frequência foram: *S. flexneri* (52,7%) e *S. sonnei* (44,2%). As taxas mais elevadas de isolamento de *Shigella* foram observadas nas regiões Sudeste (39%) e Nordeste (34%) e a menor percentagem de isolados ocorreu na região Sul (3%) do Brasil (PEIRANO; SOUZA; RODRIGUES, 2006).

1.3.5 Caracterização fenotípica por resistência a antimicrobianos

O uso indiscriminado de antimicrobianos pode possibilitar a seleção de microrganismos resistentes, reduzindo a eficácia dos medicamentos. Internações mais longas, o uso de drogas mais caras e mais tóxicas são algumas das conseqüências do uso inadequado dessas drogas, o que, além de dificultar e encarecer os tratamentos pode até impossibilitá-los.

Para controlar essa resistência, é preciso mapear o perfil de resistência dos organismos que atingem hospitais e a população, ou seja, analisar o efeito dos medicamentos sobre esses microrganismos (BRASIL, 2005).

Além disso, a análise da resistência a antimicrobianos tem sido bastante utilizada, juntamente com outros métodos, para a caracterização de vários microrganismos, dentre eles *Shigella*. Tais tipificações têm sido realizadas tanto no Brasil (PENATTI, M.P.A., et al., 2007), quanto em países como o Chile (FULLÁ, N., et al., 2005), Espanha (FLORÉZ, et al., 2005) e Iran (SAVADKOOHI; KACHO, 2007).

1.3.6 Resistência a antimicrobianos em *Shigella*

Shigella spp. são conhecidas devido a sua múltipla resistência a antimicrobianos. Esta resistência vem sendo adquirida progressivamente, na maioria dos casos, devido ao uso indiscriminado dessas drogas (SOW, G. A., et al., 2006).

Em um estudo realizado em Dakar, Senegal, 43 *S. sonnei* isoladas de pacientes adultos com diarreia foram submetidas ao teste de resistência a antimicrobianos. Todos os isolados foram resistentes à estreptomicina, à spectinomomicina e à tetraciclina, e 37 (86%) dos isolados foram resistentes ao trimetoprima e à sulfametoxazol-trimetoprima, resultado este que reafirma o caráter de múltipla resistência dos isolados de *Shigella* (SHOW, G. A. et al., 2006).

Na Venezuela, Morales et al. (2005) avaliaram a resistência a 20 antimicrobianos de isolados de *Salmonella* e *Shigella* provenientes de pacientes do West General Hospital, no período de 1997 a 2003. Neste período, foram selecionados 212 isolados clínicos, dos quais 107 (50,5%) foram identificados como *Salmonella* spp. e 105 (49,5%) como *Shigella*. As espécies de *Shigella* identificadas foram: *S. flexneri* (62,9%), *S. sonnei* (29,5%), *S. dysenteriae* (4,8%) e *S. boydii* (12,9%). Dentre os isolados de *S. flexneri*, 15,9% demonstraram resistência a ampicilina/sulbactam, 3,2% a gentamicina, e 100% foram suscetíveis a ciprofloxacina, netilmicina e tobramicina. Dos isolados de *S. sonnei* 10,7% foram resistentes a ampicilina/sulbactam e 100% suscetíveis a ciprofloxacina e gentamicina e tobramicina.

Em outro estudo, 62 *S. sonnei* isoladas de casos esporádicos de Shigelose, ocorridos em diferentes localidades da Malásia, entre 1997 e 2000, foram examinadas pelo teste de suscetibilidade a antimicrobianos. Entre os isolados, aproximadamente 35,5% foram resistentes a três ou mais agentes antimicrobianos. Neste estudo os autores concluíram que uma nova cepa de *S. sonnei* multi-resistente foi observada em diferentes partes da Malásia (HOE, C. H., et al., 2005).

No Brasil, um estudo realizado por Sidrim et al. (1998), verificou resistência a antimicrobianos mediada por plasmídeos R em 26 cepas de *S. flexneri* isoladas no nordeste, no período de 1989-1993. Todas as cepas mostraram-se resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima, ampicilina e tetraciclina; 23 (88,4%) a carbenicilina e ampicilina/ácido-clavulânico; 22 (84,6%) ao cloranfenicol; 3 (11,5%) à tobramicina; 2 (7,6%) à gentamicina e 1 (3,8%) à ceftriaxona, cefalotina, cefuroxima e netilmicina. Todas as *S. flexneri* testadas foram sensíveis ao ácido nalidíxico, aztreonam, ciprofloxacina, ceftazidima, cefoxitina, cefotaxima, imipenem e amicacina.

Outro estudo realizado no Brasil com 296 *Shigella* isoladas do período de 1999 a 2004, pela IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro (RJ), sugeriu a necessidade de monitoramento contínuo de Shigeloses. O resultado deste estudo demonstrou altas

percentagens de resistência ao trimetoprima-sulfametoxazol (90%), a tetraciclina (88%), a ampicilina (56%) e ao cloranfenicol (35%) (PEIRANO; SOUZA; RODRIGUES, 2006).

1.3.7 Caracterização genotípica de microrganismos

Entre os métodos moleculares mais utilizados para a caracterização genotípica de microrganismos patogênicos estão: a ribotipificação, a PCR (Polymerase Chain Reaction), a PCR em tempo real (Real Time PCR), a PCR ribotipificação (PCR Ribotyping) e o multiplex PCR (mPCR) (MENDOZA; MARTIN; HEVIA, 1996; LINDQVIST, 1999; THIEM, V. D., et al. 2004; OLIVEIRA, F. A., 2005; THONG, K.L. et al. 2005). Além destes, outro método muito utilizado é a eletroforese em gel campo de pulsado (PFGE) (LITWIN, et al., 1997, NAVIA et al., 1999; OLIVEIRA, F. A., et al., 2008). Este último, foi por um longo tempo, considerado padrão-ouro para a caracterização de muitas bactérias, entre as quais *Shigella* spp. Tem a vantagem de ser universal (GEMMEL, 1999). Em contraposição, pode ser considerado relativamente caro e elaborado, pois exige conhecimentos especializados e equipamento especial (NAVIA; GASCO'N, 2005).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular apresentam algumas vantagens sobre os métodos convencionais, como o maior poder de discriminação e melhor reprodutibilidade (WARREN ; PARISH; SCHNEIDER, 2006, JAMIL, M., et al, 2007; GANDRA, E.A., et al, 2008). Além disso, as técnicas tradicionais baseiam-se em características morfológicas e bioquímicas para a tipificação e identificação de gêneros, espécies e subespécies de microrganismos, (GANDRA, E.A., et al, 2008) que incluem padrões de resistência aos antibióticos, reações bioquímicas, e sorológicas e muitas vezes são ineficientes e morosos (JAMIL, M., et al., 2007).

A aplicação de métodos moleculares na investigação de surtos, e na correlação entre os mesmos podem ser empregados, tanto para a identificação da fonte do agente etiológico e seus veículos de transmissão como na monitoração de seus reservatórios (MILLEMANN, Y. et al., 1995).

1.3.7.1 Caracterização por PCR- ribotipificação

A PCR ribotipificação (PCR Ribotyping), é considerada uma substituta da Ribotipificação clássica. Esta técnica utiliza seqüências iniciadoras que anelam nas

regiões 16S e 23S e amplificam seqüências presentes entre os genes do *operon* ribossomal. As regiões espaçadoras entre as regiões 16S e 23S apresentam variações que podem ser utilizadas para caracterizar os microrganismos em nível de gênero, espécie e subespécie (BAUDART, J., et al., 2000; FARBER, J.M., et al., 2001).

Diversos autores vêm utilizando essa técnica para tipificação de bactérias presentes no intestino humano, como por exemplo, o *Clostridium difficile*. Numerosos métodos de tipificação molecular têm sido desenvolvidos para diferenciar cepas de *C. difficile*. A PFGE é aceita, dado que é considerada a técnica padrão-ouro para o tipificação de cepas bacterianas, porém a maioria dos *C. difficile* isolados não podem ser tipificados por este método devido à degradação do DNA. Além disso, este método exige recursos humanos qualificados, intensivos, e muitas vezes o trabalho é moroso (HYETT; BRAZIER; O'NEIL, 1997; KATO, H., et al., 1996). A PCR-Ribotipificação é um dos métodos utilizados maior freqüência na investigação epidemiológica de *C. difficile* (TERHES, G. et al., 2006) em países como Itália (SPIGAGLIA, P., et al, 2001), Canadá (MacCANNELL, D. R., et al., 2006), Hungria (TERHES, G. et al.,2006) e Escócia (MUTLU, E., et al., 2007).

No Brasil, Geimba et al. (2003) consideraram a técnica de PCR-Ribotipificação bastante reprodutível e apropriada para a tipificação de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares do RS. Em 2005, Oliveira também destacou a adequação e a boa reprodutibilidade da PCR-Ribotipificação na caracterização molecular de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em surtos e também destacou o custo relativamente baixo de execução dessa técnica.

Devido à sensibilidade e poder de discriminação da PCR-Ribotipificação aplicada com sucesso a cepas de *Salmonella*, as quais são bastante semelhantes à *Shigella*, tal método pode ser empregado na tipificação de *Shigella* causadora de surtos alimentares, sendo um dos objetivos do presente estudo.

CAPÍTULO 2

2.1 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são apresentados na forma de um artigo científico. O subtítulo deste capítulo corresponde ao artigo formatado de acordo com as orientações do **Brazilian Journal of Microbiology**, onde ele será submetido para publicação.

2.1.1 Artigo 1 Antimicrobial Resistance and PCR-Ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil

Antimicrobial Resistance and PCR-Ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil

Cheila M. Daniel de Paula¹, Mercedes P. Geimba², Patrícia H. do Amaral¹, and Eduardo C. Tondo*¹

¹Departamento de Ciências de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ²Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

*Corresponding author - ICTA/UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP 91501-970, Caixa Postal 15090, Porto Alegre, Brasil. E-mail: tondo@ufrgs.br

1 **ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PCR-RIBOTYPING OF *SHIGELLA***
2 **RESPONSIBLE FOR FOODBORNE OUTBREAKS OCCURRED IN**
3 **SOUTHERN BRAZIL**

5 **ABSTRACT**

6 Few information about *Shigella* responsible for foodborne Shigellosis is available in
7 Brazil. The present study aimed to investigate the antimicrobial resistance and PCR-
8 Ribotyping of *Shigella* isolates responsible for foodborne outbreaks occurred in Rio
9 Grande do Sul State (RS), Southern Brazil. *Shigella* strains (n=152) were isolated from
10 foods and fecal samples of victims of Shigellosis outbreaks investigated by the
11 Surveillance Service of RS in the period between 2003 and 2007. Isolates were
12 identified at specie level and the antimicrobial resistance and PCR-Ribotyping patterns
13 were analyzed. Results indicated that 71.14 % of the isolates were identified as *S.*
14 *flexneri*, 21.48 % as *S. sonnei*, 0.67 % as *S. dysenteriae*, and 6.71 % as *Shigella* spp. An
15 increasing frequency of *S. sonnei* isolation was verified after 2004. The highest
16 resistance frequencies were verified against streptomycin (88.59 %), ampicillin (84.56
17 %), and sulfamethoxazole/trimethoprim (80.53 %). Experiments revealed 73 resistance
18 patterns, and the profile A grouped the highest number of isolates (N=36), all resistant
19 to ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, streptomycin,
20 chloramphenicol, and intermediate resistance to kanamycin. PCR-Ribotyping identified
21 three banding patterns (SH1, SH2, and SH3). SH1 grouped all *S. flexneri*, SH2 grouped
22 all *S. sonnei*, and SH3 grouped the *S. dysinteriae* strain. According to the results, several
23 *Shigella* isolates shared the same PCR-Rybotyping banding pattern and also the same
24 resistance profile, suggesting that it is the same *Shigella* strain. However, other

25 molecular typing methods need to be applied to confirm the clonal relationship of these
26 isolates.

27 **Keywords:** Shigellosis, *Shigella*, antimicrobial, PCR-Ribotyping, RS/Brazil.

28

29 **RESISTENCIA ANTIMICROBIANA E PCR-RIBOTIPIFICAÇÃO DE**
30 **SHIGELLA RESPONSÁVEIS POR SURTOS ALIMENTARES OCORRIDOS NO**
31 **SUL DO BRASIL**

32

33 **RESUMO**

34 No Brasil existem poucas informações disponíveis a respeito de surtos alimentares
35 causados por *Shigella*. O presente estudo teve como objetivo investigar cepas de
36 *Shigella* responsáveis por surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul (RS),
37 Brasil, através da resistência a antimicrobianos e PCR-Ribotipificação. As cepas (n =
38 152) foram isoladas a partir de alimentos e de fezes de vítimas de Shigeloses
39 investigadas pela Vigilância Sanitária do RS, no período entre 2003 e 2007. Os
40 resultados indicaram que 71,14% dos isolados foram *S. flexneri*; 21,48% *S. sonnei*;
41 0,67% *S. dysenteriae* e 6,71% *Shigella* spp. Um aumento na frequência de isolamento
42 de *S. sonnei* foi observado após 2004. As maiores porcentagens de resistência foram
43 observadas para estreptomicina (88,59%), ampicilina (84,56%) e
44 sulfametoxazol/trimetoprim (80,53%). Foram identificados 73 perfis de resistência,
45 sendo que o perfil A agrupou o maior número de isolados (n=36), todos resistentes à
46 ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e
47 resistência intermediária à kanamicina. A PCR-Ribotipificação identificou três padrões
48 de bandas (SH1, SH2, e SH3). O padrão SH1 agrupou todas as *S. flexneri*, o SH2 as *S.*
49 *sonnei*, enquanto o padrão SH3 agrupou a *S. dysintertiae*. De acordo com os resultados,

50 várias cepas de *Shigella* apresentaram o mesmo padrão de bandas na PCR-
51 Ribotipificação e também o mesmo perfil de resistência, sugerindo tratar-se da mesma
52 cepa de *Shigella*. No entanto, outros métodos de tipificação molecular devem ser
53 aplicados a fim de confirmar a relação clonal destes microrganismos.

54 **Palavras-chave:** Shigelose, *Shigella*, antimicrobianos, PCR-Ribotipificação, RS/Brasil.

55

56

INTRODUCTION

57 Many microorganisms can cause foodborne diseases; however, *Shigella* has
58 been identified as one of the most important agent of diarrhea by World Health
59 Organization (WHO) (49). Kotloff et al. (24) reported a Shigellosis incidence of 165
60 million cases annually, with more than 1.1 million deaths. According to Silva et al. (42),
61 Shigellosis is currently an important health problem around the world, occurring
62 predominantly in children younger than five years old, mainly in developing countries.
63 Shigellosis is caused by *Shigella* spp., including *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*,
64 *Shigella boydii* and *Shigella sonnei* (25). Among *Shigella* species, *S. flexneri* and *S.*
65 *sonnei* are the most prevalent in the developing and industrialized countries,
66 respectively (33, 38).

67 *Shigella* is generally transmitted by contaminated water, uncooked food, and by
68 contact with infected individuals (28, 49). The low infective dose, as few as 200 viable
69 organisms, facilitates the direct transmission (person to person spreading). As humans
70 and few primates are the only known reservoirs of *Shigella* (39, 49), transmission
71 among humans are common. According to Navia and Gasco'n (28) foodborne outbreaks
72 occur due to the clonal propagation of one or few *Shigella* strains.

73 *Shigella* invades the local epithelium of the colon (large intestine), resulting on
74 the symptoms of Shigellosis. The invasion of epithelial cells involves four steps: entry

75 into epithelial cells, intracellular multiplication, intra-and intercellular spreading, and
76 killing of the host cell (34). Gastroenteritis caused by *Shigella* spp. is usually self-
77 limited, although Shigellosis is one of the few enteric infections which antimicrobial
78 agents are prescribed to reduce the duration of the illness and the period of *Shigella*
79 excretion after symptoms subside. Consequently, increasing resistance against the most
80 used antimicrobials has been observed (19).

81 In Brazil there are few reports about foodborne Shigellosis, which perhaps can
82 be attributed to the fact that no current regulation requires the investigation of *Shigella*
83 in water or foods. However, according to the Central Laboratory of Rio Grande do Sul
84 (RS) State (FEPPS/LACEN/RS), this microorganism has been frequently isolated from
85 stool samples of patients with diarrhea in foodborne outbreaks occurred in Southern
86 Brazil.

87 *Shigella* has been characterized by diverse methods, including antibiotic
88 resistance and genotyping methods in Brazil (37) and in other countries as Chile (17),
89 Iran (40), and Spain (16). The determination of antibiotic resistance of *Shigella* has been
90 carried out, since it can rapidly provide information about resistant strains (4) and also
91 can serve as a preliminary typing method. However, due to the low discrimination
92 power of antimicrobial resistance typing, DNA based methods has been recommended.
93 Among them, PCR-Ribotyping has been applied with success because it is rapid to
94 perform, presents relatively low cost and also has been used to type enteric pathogens
95 such as *Salmonella* (29, 20, 30).

96 Based on this, the objective of the present study was to characterize, by
97 antimicrobial resistance and PCR-Ribotyping, *Shigella* isolates responsible for
98 foodborne outbreaks occurred in the Southern Brazil.

99

MATERIAL AND METHODS

101 **Bacterial strains, identification and serotyping**

102 *Shigella* isolates

103 *Shigella* strains used in this study were obtained from stool samples of
104 Shigellosis patients and from foods involved in outbreaks occurred in different localities
105 of Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. *Shigella* strains isolated from foods were
106 collected in a 12-month period, between August 2007 and August 2008. Samples of
107 suspected foods were collected during epidemiological investigation of foodborne
108 outbreaks carried out by the Sanitary Surveillance Division of Rio Grande do Sul. Such
109 foodborne outbreaks were suspected to be Salmonellosis or Shigellosis, according to the
110 symptoms and epidemiological data. Samples were transported to the Central
111 Laboratory of Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN/RS) to be analyzed according
112 methods described in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of*
113 *Foods* (2). The results were compared to parameters described in the federal regulation
114 RDC 12/2001 (3). Since this regulation does not require the investigation of *Shigella* in
115 food samples, plates of selective medium Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar,
116 Oxoid Ltd., Hampshire, England) and *Salmonella Shigella* agar (SS Agar, Oxoid Ltd.,
117 Hampshire, England) used for the *Salmonella* isolation were used for *Shigella* detection.
118 Then, after official investigation carried out in FEPPS/IPB/LACEN/RS, disposed plates
119 used for *Salmonella* investigation were sent to the Food Microbiology Laboratory of
120 Food Science and Technology Institute of Federal University of Rio Grande do Sul
121 (ICTA/UFRGS). Typical colonies of *Shigella* were investigated in 1200 plates, and 217
122 *Shigella* suspected colonies were collected. The suspected colonies were recovered in
123 BHI Agar (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid Ltd., Hampshire, England), and submitted
124 to the following tests for identification: motility, hydrogen sulphide production, indole

125 production, use of citrate, glucose, sucrose, and lactose fermentation in TSI medium
126 (Triple Sugar Iron agar, Oxoid Ltd., Hampshire, England), and lysine decarboxylase in
127 LIA medium (Lysine Iron agar, Difco, Detroit, Michigan). After identification, *Shigella*
128 isolates were confirmed by sorology, according to Bacteriological Analytical Manual -
129 BAM (15) using antiserum supplied by Probac do Brasil (São Paulo, Brazil).

130 Other 149 *Shigella* isolates were obtained from fecal samples of suspect
131 Shigellosis patients, presenting symptoms as nausea, vomits, and diarrhea. Sampling
132 collection was carried out between January 2003 and December 2007 (Table 1).
133 *Shigella* strains were isolated and identified by the Bacteriology Section of
134 FEPPS/IPB/LACEN/RS, and sent to the Food Microbiology Laboratory of
135 ICTA/UFRGS for further characterization by antimicrobial resistance and PCR-
136 Ribotyping.

137

138 **Antimicrobial resistance testing**

139 *Shigella* isolates were analyzed for susceptibility to nine different antimicrobial
140 agents by the disc diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards
141 Institute (8). The antimicrobial drugs used and their respective concentrations ($\mu\text{g}/\text{disc}$)
142 were: ampicillin (AMP), 10; tetracycline (T), 30; gentamicin (GEN), 10; nalidixic acid
143 (NAL), 30; chloramphenicol (C), 30; streptomycin (S), 10; ciprofloxacin (CIP), 5;
144 supplied by Laborclin (Paraná, Pinhais, Brazil) and sulfamethoxazole/trimethoprim
145 (SXT), 25; kanamycin (K), 30; supplied by Oxoid (Hampshire, United Kingdom).
146 *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain for internal control. For
147 the purpose of typing, resistance patterns were determined, creating a numerical code
148 profile based on antibiotic resistance of each isolate. Resistance was classified as 1,
149 intermediate resistance as 2, and full sensitivity was classified as 3 (46).

150 **PCR-Ribotyping**

151 *Extraction of DNA:* the genomic DNA was extracted by heat treatment, as
152 described below: one colony of each isolate was inoculated in 3 ml of BHI broth (Oxoid
153 Ltd., Hampshire, England) and incubated overnight at 37° C. After incubation, 1 ml
154 suspensions of bacterial cells were centrifuged at 5000g for 4 minutes in a
155 microcentrifuge Eppendorf model 5415C, at room temperature. The supernatant was
156 discarded and the pellet was suspended in 1 ml of TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM
157 EDA pH 8.0). This step was repeated twice. The pellet was suspended in 100 µl of TE
158 and kept at thermal block for 10 minutes at 95° C, and was centrifuged at 14000 g, for
159 20 seconds. The supernatant was used directly in the PCR reactions, as described below.

160 *PCR amplification:* the primers used were previously proposed by Jensen and
161 Hubner (22) and were specific for the amplification of the spacer region between 16S
162 and 23S rRNA genes. The sequences of the primers were the following: 5' CAA GGC
163 ATC CAC CGT GT 3' and 5' GTG AAG TCG TAA CAA GG 3'. Each set of PCR
164 reactions included a control without DNA template. The PCR-Ribotyping mixture (25
165 µl) consisted of 2.5 µl of reaction buffer (100 mmol l⁻¹ Tris HCl, 750 mmol l⁻¹ KCl pH
166 8.8), 0.4 µl of 10 mmol l⁻¹ dNTPs (5 mmol l⁻¹ of each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP),
167 1 µl of 50 mmol l⁻¹ MgCl₂, 2 µl of each primer (20 µmol), 0.4 U of *Taq* DNA
168 Polymerase 2 U/µl (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 14.9 µl sterile ultrapure water, and 2
169 µl DNA. The program used for the amplification was as follows: one initial cycle of 94°
170 C for 2 minutes, followed by 25 cycles of 94° C for 15s, 55° C for 4 minutes and 72° C
171 for 1 minute, and a final extension step of 72° C for 30 minutes. Amplifications were
172 carried out on a Minicycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) and 10 µl of
173 amplified products were resolved by electrophoresis in 2.0 % agarose gel in TBE buffer.
174 The gels were stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

175 DNA from strains with different electrophoretic banding patterns were tested at
176 least twice to evaluate the reproducibility of the method. The discriminatory power of
177 the method was tested analysing strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC
178 25923, *E. coli* O157:H7, *S. Cholerasuis* ATCC 10708, and *S. Enteritidis* 3091/05. The *S.*
179 *Enteritidis* 3091/05 was used as a control strain in all PCR-Ribotyping amplifications.
180 The strains were visually compared and ascribed to the same PCR-Ribotyping when
181 their DNA amplified banding patterns were identical.

182

183 RESULTS AND DISCUSSION

184 Isolation of *Shigella*

185 Three *Shigella* strains were isolated from food samples involved in foodborne
186 outbreaks occurred in RS. Strains were classified as *S. flexneri* (n=2) and *S. sonnei*
187 (n=1), and were isolated from plates considered negative for the presence of *Salmonella*
188 by the Official Laboratory of RS (FEPPS/IPB/LACEN/RS). As the investigation of
189 *Shigella* is not mandatory in food according to the Brazilian legislation and no
190 *Salmonella* was found in these food samples, the etiologic agent of those outbreaks
191 could have been considered unidentified. According to Carmo et al. (5), the etiologic
192 agent was not identified in approximately 80 % of the 3.737 notified foodborne
193 outbreaks occurred in Brazil, during the period of 1994 to 2004. This high percentage of
194 unidentified causal agents can be attributed to different factors as: lack of food samples
195 to be analyzed, the sensitivity of the analysis methods, emerging pathogens not detected
196 by classic methods, and the lack of official mandatory regulation for food pathogens, as
197 *Shigella*.

198 *Shigella* is phylogenetically related to *Salmonella*, and both are related to
199 *Escherichia coli* (18). Based on this fact, the diagnosis of Shigellosis, as well as their

200 identification by culture methods has become difficult. Currently, specific selective
201 media are not available for the isolation of *Shigella* from food samples. In the present
202 work the isolation of *Shigella* was possible using methods recommended for *Salmonella*
203 according to the American Public Health Association's Compendium of Methods for
204 the Microbiological Examination of Foods - CMMEF (26) and to the FDA
205 Bacteriological Analytical Manual (BAM) (15). Recently Warren et al. (47) wrote a
206 review about methods for detection of *Shigella* in foods, and cited such methodologies.
207 However, the same authors emphasize the need for an appropriate conventional culture
208 protocol specific designed for the detection of *Shigella* in foods.

209 *Human fecal samples*

210 From human fecal samples, 149 *Shigella* isolates were isolated. Among them,
211 71.14 % (n=106) were classified as *S. flexneri* and 21.48 % (n=32) as *S. sonnei*. Only
212 0.67 % (n=1) of the isolates were classified as *S. dysenteriae*, and 6.71 % (n=10) of the
213 samples were identified as *Shigella* spp. These results were similar to those obtained by
214 Savadkoohi and Kacho (40) who reported that among 260 stool samples positive for
215 *Shigella*, 70 % was *S. flexneri* and 30 % was *S. sonnei* (30 %) in Iran.

216 In Brazil, Peirano et al. (36) studied 296 *Shigella* spp. isolated by the Laboratory
217 for Cholera and Enteric Diseases (NRLCED) of IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro. These
218 strains were isolated from human fecal samples in hospitals and outbreaks, during the
219 period of 1999 to 2004. The results have demonstrated 52.7 % of *S. flexneri*, 44.2 % of
220 *S. sonnei*, 2.3 % of *S. boydii*, and 0.6% of *S. dysenteriae*.

221 Silva et al. (42) demonstrated that *Shigella* represented the fourth cause of
222 diarrhea in 877 infants assisted by the public hospital of Rondônia (Western Amazon
223 region, Brazil), and among 25 isolates identified, 72 % were *S. flexneri*, 12 % *S. sonnei*,
224 12 % *S. boydii*, and 4 % *Shigella dysenteriae*.

225 In the United States, during the period of 1999 to 2002, the CDC tested 1,604
226 *Shigella* isolates from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System for
227 Enteric Bacteria (NARMS). Among 1,598 isolates identified to species level, 1,278 (80
228 %) were *S. sonnei*, 295 (18 %) were *S. flexneri* (16 %), 18 (1 %) were *S. boydii*, and 7
229 (0.4 %) were *S. dysenteriae* (43).

230 The prevalence of *Shigella* specie varies over time and in different geographical
231 areas. *S. sonnei* is the most prevalent specie (>80 %) in the developed countries. On
232 other hand, in developing countries, *S. flexneri* has been the most common (25). The
233 results of the present study demonstrated that only *S. flexneri* was isolated in RS during
234 2003. However, in 17.86 % of the Shigellosis of 2004, the agent identified was *S.*
235 *sonnei*, progressively increasing to 43.48 % in 2007. Consequently, the incidence of *S.*
236 *flexneri* decreased expressively. For example, while in 2003 all isolates were identified
237 as *S. flexneri*, in 2007 they account for only 47.83 % of the outbreaks (Table 1).

238 According to Chuang, et al. (9), in Taiwan during 1995 to 2000, between 250
239 and 500 cases of Shigellosis were identified annually. The majority were caused by *S.*
240 *flexneri* and *S. sonnei*, which accounted for 73.3 % and 26.5 % of the total strains
241 isolated, respectively. However, from 2001 to 2003, *S. sonnei* replaced *S. flexneri* as the
242 predominant specie in central Taiwan (48).

243 According to Table 2, *Shigella* was isolated most frequently from children under
244 5 years of age, accounting for 40.7 % of all isolates. People aged 5-19 years were
245 involved in approximately 19.0 % of the cases, and patient aged 20-59 years were
246 identified in 16.11 % of the cases. The overall distribution of *Shigella* isolates by gender
247 was similar, with females accounting for 44.3 % of the isolates and male accounting for
248 48.99 %.

249 The *Shigella Surveillance: Annual Summary 2005* (6) reported that the isolation
250 of *Shigella* accounted for 30.0 % of all cases of Shigellosis in children under 5 years of
251 age, 34.3 % of isolates came from persons aged 5-19 years, and 26.6 % from persons
252 aged 20-59, in United States. Differences on gender were not verified.

253

254 **Antimicrobial resistance testing**

255 Antimicrobial resistance of 152 isolates of *Shigella* is demonstrated in Table 3.
256 The higher resistance percentages were demonstrated against streptomycin (88.59 %),
257 ampicillin (84.56 %), and sulfamethoxazole/trimethoprim (80.53 %), and the highest
258 frequency of intermediate resistance was displayed against kanamycin (61.74 %). The
259 majority of the isolates were sensitive to ciprofloxacin (96.64 %), nalidixic acid (89.26
260 %), and gentamicin (83.22 %). Savadkoohi and Kacho (40) studied *Shigella* species
261 among children with acute diarrhea in the North of Iran and reported high resistance
262 rates to sulfamethaxazole/trimetoprim (73.84 %) and to ampicillin (73.84 %). The
263 sensitivity to ciprofloxacin was similar to our results (97.3 %). Silva et al. (42) studied
264 *Shigella* spp. isolated from a public hospital in Rondônia/Brazil, and demonstrated high
265 levels of resistance to sulfamethoxazol/trimethoprim and ampicillin.

266 In a study conducted in northeastern Brazil, Sidrim *et al.* (41) reported 26 strains
267 of *S. flexneri* resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim (100 %), ampicillin (100 %),
268 and tetracycline (100 %). Resistances to chloramphenicol and gentamicin were verified
269 in 84.6 % and 7.6 % of the isolates, respectively, and all samples were sensitive to
270 nalidixic acid and ciprofloxacin.

271 According to our results, both *S. flexneri* and *S. sonnei* showed high percentages
272 of resistance to ampicillin, streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, but there were
273 differences in resistance to other antimicrobial agents. The *S. flexneri* showed higher

274 resistance to tetracycline (79.25 %) and chloramphenicol (73.6 %) than *S. sonnei* (3.13
275 % and 6.25 %) (data not shown). According to the National Antimicrobial Resistance
276 Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS), there were differences in resistance
277 against antimicrobial agents between *S. flexneri* and *S. sonnei*. In the NARMS Human
278 Isolates Final Report, 2005, *S. flexneri* showed a higher resistance to tetracycline and
279 chloramphenicol, while *S. sonnei* isolates showed a higher resistance to streptomycin
280 and sulfamethoxazole/trimethoprim. The percentage of isolates with no detected
281 resistance was low in *S. sonnei* (4.4 %) and *S. flexneri* (5.8 %) (7).

282 Based on the antimicrobial resistance of each isolate tested, 73 patterns were
283 identified. Table 4 presents the most expressive resistance patterns, i. e. profiles
284 grouping four or more isolates from stool samples. Table 4 also presents the three
285 profiles containing the food isolates (G, H, and I). These nine patterns together grouped
286 44.08 % of the isolates.

287 The results indicated that the resistance to at least one drug was verified in 147
288 isolates (96.71 %), and only two isolates were sensitive to all drugs tested. Multiple
289 resistance (here defined as the resistance to two or more drugs) was observed in 137
290 isolates (90.19 %) and, among them, 82.23 % were resistant to three or more antibiotics.
291 Food isolates demonstrated resistance only to gentamicin and intermediate resistance to
292 chloramphenicol, tetracycline, and sulfamethoxazole/trimethoprim, being classified in
293 the patterns G, H, and I. Each one of the food isolates was classified alone in one of
294 these patterns, suggesting being different microorganisms from those found in fecal
295 stool samples.

296 Resistance profile A was composed by 36 *S. flexneri*, all resistant to ampicillin,
297 sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, and
298 intermediate resistant to kanamycin. Profile B grouped nine *S. flexneri* isolates (5.92

299 %), differing from the profile A only by the sensitivity to chloramphenicol. Profile C
300 and D grouped five *S. flexneri* each, and profile E grouped five *S. sonnei*. The other
301 isolates (n=85) were grouped in further 65 patterns, and accounted for 55.92 % of the
302 tested isolates. The most multi-resistant microorganisms were one isolate of *S. flexneri*
303 presenting resistance to ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline,
304 streptomycin, chloramphenicol, and kanamycin, classified as profile M, and two isolates
305 of *S. flexneri*, presenting resistance to ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim,
306 tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, and gentamicin (profile N).

307 Several studies have reported the involvement of resistant *S. sonnei* and *S.*
308 *flexneri* in foodborne diseases. For example, among 392 *Shigella* isolates obtained from
309 stool specimens of persons with acute diarrhea in southern Trinidad, during 1997-2006,
310 *S. sonnei* was isolated from 75 % of the samples and demonstrated resistance to all
311 antibiotics tested (ampicillin, tetracycline, sulphamethoxazole/trimethoprim,
312 amoxicillin-clavulanic acid, cefuroxime, chloramphenicol, ciprofloxacin, aztreonam,
313 and gentamicin) (32). In Calcutta, during a 4-year period (2001 to 2004), the resistance
314 of 193 *Shigella* isolated from hospitalized children with diarrhea were studied. *S.*
315 *flexneri* (60.6 %) was the most prevalent specie, followed by *S. sonnei* (23.8 %). Almost
316 all *S. flexneri* isolates exhibited resistance to ampicillin, cotrimoxazole, tetracycline,
317 nalidixic acid and fluoroquinolones (35).

318 Over a 12-year period, 68 *Shigella* isolates (31 *S. sonnei*, 30 *S. flexneri*, 4 *S.*
319 *dysenteriae*, and 3 *S. boydii*) were collected in a French University Hospital from the
320 stools of patients with recent history of travel to various parts of the world (91 %),
321 particularly Africa (67 %). These isolates were often resistant to streptomycin,
322 spectinomycin, trimethoprim, tetracycline, and sulfonamides, resistant to ampicillin and
323 chloramphenicol (66 to 84 %), or resistant to nalidixic acid. Multi-resistance was

324 verified in 87 % of the isolates, and a total of 13 antibiotic resistance patterns were
325 identified (14).

326 In Brazil, a study conducted over a period of 24 months aiming to assess the
327 resistance of enteropathogens in children with diarrhea in Rondônia (Western Amazon
328 region, Brazil) detected high levels of resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim,
329 ampicillin, ampicillin, penicillin and cotrimoxazol. Eighteen *S. flexneri* isolates displayed
330 resistance to multiple antibiotics, as well as a low frequency of resistance to nalidixic
331 acid and quinolones (ciprofloxacin and norfloxacin) (42). Other study comprising 62
332 *Shigella* (47 *S. flexneri*, and 15 *S. sonnei*) isolates selected from fecal samples of the
333 National Reference Laboratory for Cholera and Enteric Diseases (NRLCED)-
334 IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, during 1999–2003, has reported fully
335 susceptible to nalidixic acid, ciprofloxacin and gentamicin. All but one (cefalothin
336 resistant) was cephalosporin-susceptible. A total of eight antimicrobial resistance
337 profiles were identified. The profile AMP, SMX, TMP, SPT, STR, TET, CHL grouped
338 38 *S. flexneri* and was the most common pattern. Profile SMX, TMP, SPT, STR, TET
339 was demonstrated by 12 *S. sonnei* (36).

340 Emerging patterns of antimicrobial resistance of *Salmonella* and *Shigella* species
341 are a serious concern in several parts of the world where enteric and typhoid fever and
342 other forms of Salmonellosis and Shigellosis are endemic. The emergence of multi-
343 resistant strains has important clinical and public health implications for populations at
344 risk, for this reason surveillance is continuously needed (27). The emergence of resistant
345 *Shigella* spp. strains, resulting in increased mortality, presents a major threat to disease
346 control, particularly in less developed countries where antibiotics are frequently
347 prescribed on an empirical basis. According to Dromigny et al. (13) regular studies

348 should be conducted in order to monitor drug resistance and contribute to bacterial
349 diarrhea control efforts.

350

351 **PCR-Ribotyping**

352 In the present study PCR-Ribotyping was able to discriminate *Shigella* species
353 and other bacterial genera since samples containing DNA of *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S.*
354 *aureus* ATCC 25923, *S. Cholerasuis* ATCC 10708, and *S. Enteritidis* 3091/05 yielded
355 distinct banding patterns. Interestingly, *Shigella* species were not differentiate from *E.*
356 *coli* ATCC 25922 and *E. coli* O157:H7. According to Coimbra et al. (8) *Shigella* spp.
357 (except *S. boydii* serotype 13) and *Escherichia coli* constitute a single DNA relatedness
358 group, and on a strict scientific basis, the *Shigella* species should be considered as *E.*
359 *coli* clones. Corroborating this similarity, *Shigella* spp. and enteroinvasive *E. coli*
360 (EIEC) have been considered responsible for Shigellosis in humans (34).

361 Based on our results, among 152 (149 fecal stools isolates +3 food isolates)
362 *Shigella* isolates subjected to PCR-Ribotyping analysis, three banding patterns were
363 identified, being designated SH1, SH2, and SH3 (Fig. 1). Profile SH1 was composed by
364 *S. flexneri* (n=116) presenting a banding pattern of two bands (480 and 570bp). Profile
365 SH2 was composed by *S. sonnei* (n=35) strains presenting a banding pattern of three
366 bands (350, 480, and 570bp), and the profile SH3 grouped a *S. dysinteriae* (n=1) strain,
367 presenting a banding pattern of two bands (570, and 700bp), but with different
368 molecular weights of SH1. The bands of about 570bp were detected in all strains of
369 *Shigella* tested.

370 In the present study, PCR-Ribotyping was able to differentiate *Shigella* species
371 involved in foodborne Shigellosis from *S. Enteritidis* 3091/05. This *Salmonella* strain
372 share the same genotypic pattern (by PFGE and DNA sequencing) of *S. Enteritidis*

373 SE86, the main causative agent of investigated foodborne diseases in the State of RS, in
374 the last years (31). Based on the difficulty in the differentiation of *Salmonella* from
375 *Shigella* by conventional methods, the PCR-Ribotyping method used in our study could
376 be very suitable for the routine investigation of foodborne outbreaks in RS.
377 Furthermore, the amplification of the intergenic spacer sequences using rRNA genes has
378 proved to be useful for typing bacteria (11). These spacer regions demonstrate extensive
379 sequence and length variation that can be used to type bacteria at the genus, species and
380 subspecies level (23, 21, 12). PCR-Ribotyping presents some advantages when
381 compared to other molecular methods, mainly because it is not time-consuming or an
382 expensive method. For example, many reports have been used PFGE for typing *Shigella*
383 because it is very discriminatory and considered the “Gold Standard” for typing
384 microorganisms (16, 28, 38). However, it is technically demanding and expensive,
385 difficulting the implementation of this method especially in public health laboratories.

386 In the present study, among the 149 isolates, ten were classified as *Shigella* spp.
387 When submitted to PCR-Ribotyping, these isolates demonstrated similar banding
388 patterns of *S. sonnei* (n=2) and *S. flexneri* (n=8). Serology experiments confirmed these
389 results.

390 Our results demonstrated several strains involved in different Shigellosis
391 outbreaks presenting the same PCR-Ribotyping banding pattern and also the same
392 resistance profile, suggesting that it is the same *Shigella* strain occurring in diverse
393 localities of RS. According to Navia and Gasco'n (28), most often the cases or
394 outbreaks of Shigellosis occur due to the clonally propagation of one or a few strains.
395 However, in opposite to what should be expected, PCR-Ribotyping identified less
396 profiles than Antibiotic Resistance Testing. Even though the antimicrobial resistance in
397 microorganisms could be mediated by plasmids or other transmissible DNA elements,

398 not modifying chromosomal DNA, others molecular typing methods can be applied to
399 verify the clonally relationship of *Shigella* strains.

400

401

ACKNOWLEDGEMENTS

402 We would like to express our sincere thanks to all the staff of Central Laboratory of Rio
403 Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN/RS) by providing the samples, especially to
404 Solange Mendes Longaray and Jane Mari Correa Both of the Food Section, and to
405 Silvia da Silva Rios of the Bacteriology Section.

406

407

REFERENCES

- 408 1. Andrews, W. H.; Flowers, R. S.; Silliker, J.; Bailey J. S. (2001). *Salmonella*. In:
409 Downes, F.P., Ito, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological*
410 *examination of foods, 4th ed.*American Public Health Association. Washington,
411 D.C. p. 357–380.
- 412 2. Brasil (2001). Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico
413 princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para
414 alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02 de jan.
415 2001. Seção 1. Available at: <http://www.anvisa.gov.br>
- 416 3. Brasil (2005). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
417 Lançado projeto para prevenir resistência aos antibióticos. Notícias da Anvisa:
418 Diário e Mensal, Brasília, 22 jun.
- 419 Available at: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/220705.htm> Accessed
420 17 May 2007.

- 421 4. Carmo, G.M.I. Oliveira, A.A.; Dimech, C. P.; Santos, D. A. dos; Almeida, M. G. de; Berto, L. H.;
422 Alves, R. M. S.; Carmo, E. H. (2005). *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas*
423 *por alimentos no Brasil, 1999-2004*. Boletim eletrônico epidemiológico, Brasília.
424 Available at:
425 http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf
- 426 5. Centers for Disease Control and Prevention. (2006). *Shigella Surveillance: Annual*
427 *Summary, 2005*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.
428 Available at:
429 [http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/phlisdata/shigtab/2005/ShigellaIntroduction200](http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/phlisdata/shigtab/2005/ShigellaIntroduction2005.pdf)
430 [5.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/phlisdata/shigtab/2005/ShigellaIntroduction2005.pdf).
- 431 6. Centers for Disease Control and Prevention. (2008). National Antimicrobial
432 Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates
433 Final Report, 2005. Department of Health and Human Services, CDC.
- 434 7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance for Antimicrobial*
435 *Susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement*. (2007). CLSI document
436 M100-S17. Pennsylvania, USA.
- 437 8. Chuang, Y.Y.; Huang, Y.C.; Lin, S.Y. (2006). Outbreak of *Shigella sonnei*
438 gastroenteritis in Northeastern Taiwan. *Pediatr Infect Dis J*. 25, 92-4.
- 439 9. De Cesare, A., Manfreda, G., Dambaugh, T.R., guerzoni, M.E., Franchini, A.(2001).
440 Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for
441 molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains
442 isolated in Italy. *J. Appl. Microbiol.* 91, 780-785.
- 443 10. Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C. (1995).
444 Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*

- 445 complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences.
446 *J. Clin. Microbiol.* 33, 1108-1113.
- 447 11. Dromigny, J. A. ; Macondob, E.A.; Behr, A.J.; Siby, T.; Claude, JD. PG. (2004).
448 The distribution and antibiotic susceptibility of *Shigella* isolates in Dakar, Senegal
449 (2000–2002). *Int. J. of Antimicrobial. Agents.* Amsterdam, Vol. 24, pg. 109–110,
450 2004
- 451 12. Dubois,V. ; Parizano, MP. ; Arpin, C. ; Coulange,L. ; Bezian, MC. ; Quentin,
452 C.(2007). High Genetic Stability of Integrons in Clinical Isolates of *Shigella* spp. of
453 Worldwide Origin. . *Antimicrob. Agents Chemoth.* 51 (4), 1333–1340.
- 454 13. Food and Drug Administration (FDA). (2001). Bacteriological analytical manual.
455 8th Ed. Airlington: AOAC International, Available at:
456 <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam.>> Accessed 19 Jun 2007.
- 457 14. Flórez, A. J.; Pérez-Roth, E.; González-Linares, Sandra.; Méndez-Álvarez, S.
458 (2005). Outbreak of *Shigella sonnei* in a rural hotel in La Gomera, Canary Islands,
459 Spain. *Int. Microbiol.* 8, 133-136.
- 460 15. Fullá, N.; Prado, V.; Dura´ n, C.; Lagos, R.; Levine, M. M.et al.(2005). Surveillance
461 for antimicrobial resistance profiles among *Shigella* species isolated from a
462 semirural community in the northern administrative area of Santiago, Chile. *Am. J.*
463 *Trop. Med. Hyg.* 72 (6), 851–854.
- 464 16. Haimovich, B.; Venkatesan, M. M. (2006). *Shigella* and *Salmonella*: death as a
465 means of survival. *Microbes and Infection.* 8, 568–577.
- 466 17. Haukka, K.; Siitonen, A. (2008). Emerging resistance to newer antimicrobial agents
467 among *Shigella* isolated from Finnish foreign travelers. *Epidemiol. Infect.* 136, 476–
468 482.

- 469 18. Jamil, M.; Bashir, S.; Mohsin, M.; Tariq, A.; Bashir, A.; Haque, A.; Sarwar, Y.; Ali,
470 A.; Haque, A. (2007). Differentiation of common gram negative pathogens by PCR-
471 Ribotyping. *Pak. J. Med. Sci.* 23 (2), 233-237.
- 472 19. Jensen, M.A.; Webster, J.A.;Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on
473 the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer
474 polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945-952.
- 475 20. Jensen, M. A., Hubner, R. J. (1996). Use of Homoduplex Ribosomal DNA Spacer
476 Amplification Products and Heteroduplex Cross- Hybridization Products in the
477 Identification of *Salmonella* Serovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2741-2746.
- 478 21. Kostman, J. R.; Edlind, T. D.; LiPuma, J. J.; Stull, T. L. (1992). Molecular
479 epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction
480 ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2084-2087.
- 481 22. Kotloff, K.L.; Winickoff, J.P.; Ivanoff, B.; Clemens, J.D.; Swerdlow, D.L.;
482 Sansonetti, P.J.; Adak, G.K.; Levine, M.M. (1999). Global burden of Shigella
483 infections: implications for vaccine development and implementation of control
484 strategies. *Bull. World Health Organ.* 77, 651- 666.
- 485 23. Kuo, CY.; Su LH., Perera, J.; Carlos, C.; Tan, B. H.; Kumarasinghe, G.;So, T.; Van,
486 P. H.; Chongthaleong, A.; Song, JH.; Chiu CH. (2008). Antimicrobial susceptibility
487 of *Shigella* isolates in eight Asian countries, 2001-2004. *J. Microbiol. Immunol.*
488 *Infect.* 41,107-111.
- 489 24. Lampel, K.A. (2001). *Shigella*. In: Downes, F.P., Ito, K. (eds). *Compendium of*
490 *methods for the microbiological examination of foods, 4th ed.*American Public
491 Health Association. Washington, D.C. p. 381–385.

- 492 25. Morales, A. J. R.; Rodriguez, C. N.; GARCIA, A.; PASTRAN, B.; Meijomil, P.
493 (2005). Salmonella and Shigella Antimicrobial Resistance Patterns in a General
494 Hospital of Caracas, Venezuela 1997-2003. *Int. J. of Antimicrobial Agents*. 67-67.
- 495 26. Navia, M.M.; Gasco'n. V. J. (2005). Genetic diversity of Shigella species from
496 different intercontinental sources. *Infect. Genet. Evol.* 5, 349–353, 2005.
- 497 27. Nastasi A.; Mammina C. (1995). Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of
498 sporadic and outbreak-associated strains of Salmonella enterica serotype
499 typhimurium. *Res. Microbiol.* 146 (1), 99-106.
- 500 28. Oliveira, F. A. de; Frazzon, A. P.; Brandelli, A.; Tondo, E. C. (2007). Use of PCR-
501 ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis
502 involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *J. Infect. Developed*
503 *Country*. 1, 170-176.
- 504 29. Oliveira, F. A. de ; Geimba, M. P. ; Brandelli, A. ; Silva, W. P. ; Pasquali, G. ;
505 Tondo, E. C. (2008). Clonal relationship among *Salmonella* enterica serovar
506 Enteritidis. *Food Contr.*
- 507 30. Orrett, F. A. (2008). Prevalence of *Shigella* Serogroups and Their Antimicrobial
508 Resistance Patterns in Southern Trinidad. *J Health Popul Nutr.* 26 (4), 456-462.
- 509 31. Osorio, M.; Bray, M. D.; Walker, R. I. (2007). Vaccine potential for inactivated
510 shigellae. *Vaccine*. 25, 1581–1592. Available at: www.sciencedirect.com
- 511 32. Parsot C. (2005). *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity
512 factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 11–18.
- 513 33. Pazhani, G. P.; Ramamurthy, T.; Mitra, U.; Bhattacharya, S. K.; Niyogi S. K.
514 (2005), Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated

- 515 between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata
516 (Calcutta), India. *Epidemiol. Infect.* 133, 1089–1095
- 517 34. Peirano, G.; Souza, F. S.; Rodrigues, D. P.(2006). Frequency of serovars and
518 antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101,
519 245-250.
- 520 35. Penatti, M.P.A.; Hollanda, L.M.; Nakazato, G.; Campos¹, T.A.; Lancellotti, M.;
521 Angellini¹, M.; Brocchi, M.; Rocha, M.M.M.; Silveira, W. D. da. (2007).
522 Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri*
523 and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast
524 Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*
- 525 36. Ranjbar, R.; Mammina, C.; Pourshafie, M.R.; Soltan-Dallal, M. M. (2008).
526 Characterization of endemic *Shigella boydii* strains isolated in Iran by serotyping,
527 antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel
528 electrophoresis. *BMC Research Notes* 2008, 1:74. Available at:
529 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2547104>
- 530 37. Ribeiro, R. V. (2000). *Shigella*: aspectos gerais, clínicos e epidemiológicos.
531 Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária /
532 SCZ. Boletim de Divulgação Técnica e Científica. Secretaria Municipal de Saúde
533 SMS. Rio de Janeiro. Available at:
534 <http://www.ccs.saude.gov.br/visa/publicacoes/arquivos/bol7.pdf>. Accessed 09
535 March 2007.
- 536 38. Savadkoohi, R. B.; Kacho A. M. (2007). Prevalence of *Shigella* Species and Their
537 Antimicrobial Resistance Patterns at Amirkola Children's Hospital, North of Iran.
538 *Iran J. Ped.* 17 (2), 118-122.

- 539 39. Sidrim, J. J. C. Moreira, J.L. B.; Paixão, G. C.; Lima, S. B.; Filho, R.E. M.; Rocha,
540 M. F.G.; Lima, A. Â. M.(1998). Multirresistência a antimicrobianos mediada por
541 plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. *Revista*
542 *Soc. Brasil. Med. Trop.* 31 (3), 263-270.
- 543 40. Silva, T.; Nogueira, P. A.; Magalhães, G. F.; Grava, A. F.; Silva, L. H. P. da;
544 Orlandi, P. P. (2008). Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance
545 and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho
546 (Western Amazon region), Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103(7), 731-733.
- 547 41. Sivapalasingam, S.; Nelson, J. M.; Joyce, K.; Hoekstra, Angulo, M.;F. J.; Mintz, E.
548 D. (2006). High Prevalence of Antimicrobial Resistance among *Shigella* Isolates in
549 the United States Tested by the National antimicrobial Resistance Monitoring
550 System from 1999 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 50 (1), 49–54.
- 551 42. Tondo, E. C.; Guimaraes, M. C. M.; Henriques, J. A. P.; Ayub, M. A. Z. (2000).
552 Assesing and analysing contamination of dairy products processing plant by
553 *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can. J. Microbiol.* 46,
554 1108-1114.
- 555 43. Warren, B.R.; Parish, M. E.; Schneider, K.R. (2006). *Shigella* as a Foodborne
556 Pathogen and Current Methods for Detection in Food. *Crit. Rev.s iFood Scien.*
557 *Nutrit.* , 46, 551–567.
- 558 44. Wei, HL.; Wang, YW.; Li, CC.; Tung, S. K.; Chiou, C S. (2007). Epidemiology and
559 evolution of genotype and antimicrobial resistance of an imported *Shigella Sonnei*
560 clone circulating in central Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect..Dis.* Available at:
561 www.sciencedirect.com

- 562 45. World Health Organization (WHO). (2005). Guidelines for the control of
563 Shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Available at:
564 http://www.who.int/vaccine_research/documents/Guidelines_Shigellosis.pdf>.
565 Accessed 24 May 2007.

TABLE 1. Etiologic agent of Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, during the period of 2003 to 2007.

Year	Species	Number of cases	Percent (%)*
2003	<i>S. sonnei</i>	0	0.00
	<i>S. flexneri</i>	6	100.00
2004	<i>S. sonnei</i>	10	17.86
	<i>S. flexneri</i>	46	82.14
2005	<i>S. sonnei</i>	8	27.59
	<i>S. flexneri</i>	21	72.41
2006	<i>S. sonnei</i>	4	11.43
	<i>S. flexneri</i>	22	62.86
	<i>S. dysenteriae</i>	1	2.86
	<i>Shigella</i> spp.	8	22.86
2007	<i>S. sonnei</i>	10	43.48
	<i>S. flexneri</i>	11	47.83
	<i>Shigella</i> spp.	2	8.70

* Percent in relation to the number of cases of foodborne Shigellosis occurred in the indicated year.

TABLE 2. Distribution of cases of foodborne Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul between 2003 to 2007 according to age, gender and species of *Shigella*.

Age Group	Species	Female	Male	Unknown	Total
< 1 Year	<i>S. flexneri</i>	7	5	0	12
	<i>S. sonnei</i>	0	1	0	1
	<i>Shigella</i> spp.	0	1	0	1
1 to 4 Years	<i>S. flexneri</i>	16	17	0	33
	<i>S. sonnei</i>	2	5	0	7
	<i>S. dysenteriae</i>	0	1	0	1
	<i>Shigella</i> spp.	1	4	0	5
5 to 9 Years	<i>S. flexneri</i>	6	6	0	12
	<i>S. sonnei</i>	4	4	0	8
	<i>Shigella</i> spp.	0	1	0	1
10 to 19 Years	<i>S. flexneri</i>	3	4	0	7
	<i>S. sonnei</i>	1	0	0	1
20 to 29 Years	<i>S. flexneri</i>	3	3	0	6
	<i>S. sonnei</i>	2	1	0	3
	<i>Shigella</i> spp.	1	0	0	1
30 to 39 Years	<i>S. flexneri</i>	3	3	0	6
40 to 49 Years	<i>S. flexneri</i>	2	3	0	5
50 to 59 Years	<i>S. flexneri</i>	0	1	0	1
	<i>S. sonnei</i>	1	0	0	1
	<i>Shigella</i> spp.	1	0	0	1
60 to 69 Years	<i>S. flexneri</i>	1	1	0	2
	<i>S. sonnei</i>	1	0	0	1
70 to 79 Years	<i>S. sonnei</i>	1	0	0	1
Unknown Age	<i>S. flexneri</i>	8	8	6	22
	<i>S. sonnei</i>	1	5	3	9
	<i>Shigella</i> spp.	1	0	0	1
Total					149

TABLE 3. General percentages of antimicrobial resistance among *Shigella* spp. isolated from fecal stools associated with foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Brazil, during the years 2003 and 2007.

Antimicrobial resistance (%) of <i>Shigella</i> spp.									
	AMP	T	GEN	NAL	CIP	C	S	SXT	K
Sensitive	12.08	26.84	83.22	89.26	96.64	42.28	7.38	16.78	22.82
Intermediate resistance	3.36	12.75	6.04	8.06	3.36	2.68	4.03	2.68	61.74
Resistance	84.56	60.40	10.74	2.68	0.00	55.04	88.59	80.53	15.44

ampicillin (AMP); tetracycline (T); gentamicin (GEN); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP); chloramphenicol (C); streptomycin (S); sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT); kanamycin (K).

TABLE 4. Most expressive antimicrobial resistance pattern of *Shigella* isolated from fecal stool samples and from foods associated with foodborne Shigellosis occurred in Rio Grande do Sul, Brazil.

Pattern	Phenotype	Number of isolates for each pattern	%	Numerical code
A	AMP, SXT, T, S, C (I:K)	36	23.68	111131233
B	AMP, SXT, T, S (I:K)	9	5.92	111133233
C	AMP, SXT, T, S, C, K	5	3.28	111131133
D	AMP, SXT, T, S, C	5	3.28	111131333
E	AMP, SXT, S (I:K)	5	3.28	113133233
F	AMP, SXT, S	4	2.63	113133333
G*	GEN, (T:I), (C:I)	1	0.66	321332333
H*	(T:I), (C:I)	1	0.66	323332333
I*	(T:I), (SXT:I)	1	0.66	323333323

* food samples. Ampicillin (AMP); tetracycline (T); gentamicin (GEN); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP); chloramphenicol (C); streptomycin (S); sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT); kanamycin (K).

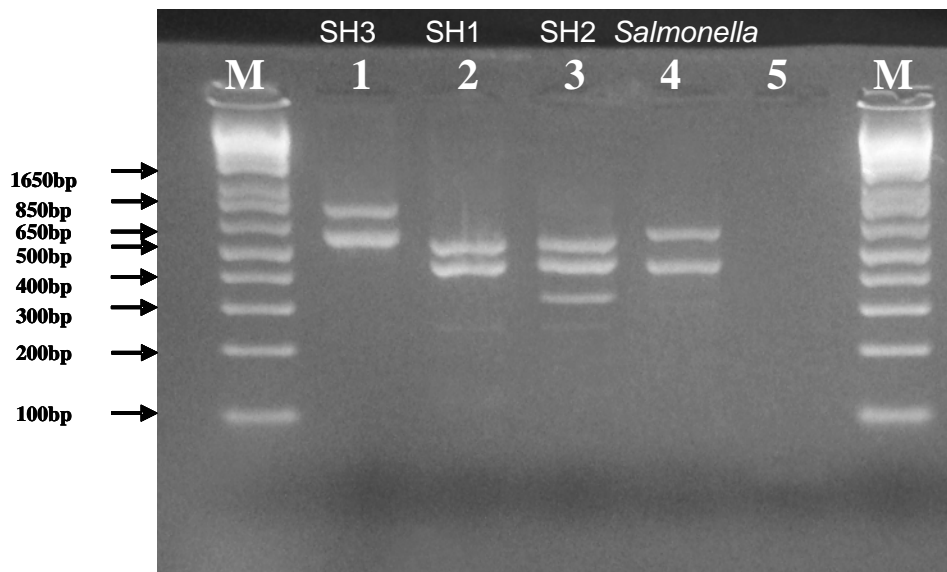


FIGURE 1. PCR-Ribotyping profiles of *Shigella* isolated from foodborne Shigellosis of Rio Grande do Sul State, Brazil. **M** Ladder (1kp by Invitrogen), **1** *S. Desyneriae* (profile SH3), **2** *S. flexneri* (profile SH1), **3** *S. sonnei* (profile SH2), **4** *Salmonella* Enteritidis (3091/05), **5** Negative Control, and **M** Ladder (1kp by Invitrogen).

CAPÍTULO 3

3.1 DISCUSSÃO GERAL

A Shigelose é apontada como um importante problema de saúde pública, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos (KOTLOFF, K.L., et al., 1999). No Brasil existem poucos relatos de Shigeloses, o que talvez possa ser atribuído a não obrigatoriedade na pesquisa de *Shigella* em água ou alimentos (BRASIL, 2001). Porém, segundo dados do Laboratório Central do Estado, FEPPS/LACEN/RS, esse microrganismo tem sido frequentemente isolado das fezes de pacientes envolvidos em surtos alimentares ocorridos no Estado. Esse fato pode ser explicado, porque, embora os alimentos envolvidos em surtos não sejam analisados para *Shigella*, a coprocultura das vítimas é analisada compulsoriamente. No presente estudo, 149 isolados de *Shigella* só puderam ser analisados porque foram coletados e armazenados pelo FEPPS/LACEN/RS, para estudos futuros.

Outro aspecto que tem contribuído com a falta de relatos sobre as Shigeloses no Brasil é o fato de que *Shigella* apresenta características fenotípicas muito semelhantes as de *Salmonella* (HAIMOVICH; VENKATESAN, 2006), principal agente causador de DTA no Brasil e no RS, segundo relatos do Ministério da Saúde (CARMO, G.M.I. et al., 2005). Essa semelhança fenotípica, adicionada à semelhança dos sintomas das vítimas e das características dos surtos, pode possibilitar que surtos causados pela *Shigella* sejam atribuídos a *Salmonella*.

No presente estudo, foram encontradas três *Shigella* isoladas a partir de placas de meio de cultura utilizadas pela FEPPS/LACEN/RS para pesquisa de *Salmonella* em alimentos suspeitos, durante o período compreendido entre agosto de 2007 e agosto de 2008. Uma vez que essas placas foram negativas para *Salmonella*, e a pesquisa de *Shigella* não foi realizada pelo Laboratório Oficial do RS, o resultado nas estatísticas epidemiológicas do Estado foi expresso como “agente do surto não identificado”. Esses resultados indicam que, possivelmente, em muitos dos casos em que o agente etiológico não foi identificado, *Shigella* poderia ter sido isolada se houvesse obrigatoriedade em sua pesquisa.

Após o isolamento e a confirmação bioquímica, os isolados de *Shigella* provenientes de alimentos foram submetidos à sorotipificação, sendo que duas amostras foram classificadas como *S. flexneri* e uma com *S. sonnei*. Também foram estudados 149 isolados de *Shigella* provenientes de amostras de fezes de pacientes com diarreia analisadas pelo setor de Bacteriologia do FEPPS/LACEN/RS, isoladas no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007. Dos 149 isolados, 71,14 %

foram classificados como *S. flexneri* e 21,48 % como *S. sonnei*. Apenas 0,67 % dos isolados foram classificados como *S. dysenteriae*, e 6,71 % foram classificados apenas como *Shigella* spp. Resultados semelhantes foram obtidos por Savadkoohi e Kacho (2007), no Irã, onde dentre 260 amostras de fezes positivas para *Shigella*, 70 % foram da espécie *S. flexneri* e 30 % da *S. sonnei* (30 %).

Shigella spp. pode ser transmitida através do consumo de alimentos e água contaminados ou através do contato direto. Nos países desenvolvimento onde os sistemas de abastecimento e de esgoto nem sempre chegam a todas as localidades e, muitas vezes, o risco de contrair Shigelose é maior, pois esta enfermidade está associada à deficiência de saneamento e higiene assim como a maioria das infecções entéricas (DUBOIS, V. ; et al., 2007). Segundo KUO et al. (2008), nos países em desenvolvimento a espécie que aparece com maior frequência é a *S. flexneri* enquanto a *S. sonnei* representa >80 % dos isolados em países desenvolvidos.

Os resultados do presente estudo também demonstraram que em 2003 apenas a espécie *S. flexneri* (100 % dos casos) foi isolada no RS. Entretanto, em 2004, 17,86 % dos casos de Shigelose foram causados por *S. sonnei*. Esse percentual foi aumentando progressivamente com o passar dos anos, alcançando, em 2007, 43,48 %. Consequentemente, a incidência de *S. flexneri* nesse período diminuiu significativamente. O aumento da incidência no isolamento de *S. sonnei* em relação à *S. flexneri* também tem sido observado em outros países. Em 2006, Chuang, et al. relataram que entre as amostras de *Shigella* isoladas entre 1995 e 2000 em Taiwan, a maioria foi das espécies *S. flexneri* e *S. sonnei*, que representaram 73,3% e 26,5% do total cepas isoladas respectivamente. A maioria dos casos de Shigelose (51,0%) ocorreu em crianças menores de 9 anos de idade. Entretanto, Kuo et al. em 2008 relataram que nos anos seguintes (2001 a 2004), houve um incremento no número de isolados de *S. sonnei* e o percentual que era de 26,5% no período anterior passou para 56%, enquanto o percentual de *S. flexneri* caiu de 73,3% para 44 %.

No presente trabalho não houve diferença na distribuição de isolados de *Shigella* em relação ao sexo feminino (44,3%) e masculino (48,99%). Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por pesquisadores da Costa Rica, das 148 amostras de fezes analisadas, 81 (54,7%) foram isoladas de mulheres e 67 (45,3%) de homens, demonstrando que não houve diferenças significativas em relação à distribuição por sexo (MORA; SOTO; SALVADOR,2003).

Casos de Shigelose em adultos normalmente estão associadas ao contato direto dos mesmos com crianças infectadas (JONSSOM, M.A. et al., 2005; HAMILTON-WEST, M. C. et al, 2007) visto que, a Shigelose geralmente apresenta uma maior taxa de ataque em crianças do que em adultos (MORERA, M.A., et al.,1995), principalmente em crianças menores de 5 anos, uma vez que, estas são mais susceptíveis (KOTLOFF, K.L., et al., 1999). Surtos em escolas, principalmente em grupos com idade pré-escolar, são relativamente freqüentes (JONSSOM, M.A. et al., 2005; DUBOIS, V. ; et al., 2007). Nos Estados Unidos 69% de todos os episódios e 61% por cento de todas as mortes relacionadas com *Shigella* envolvem crianças menores de 5 anos. A base do tratamento da Shigelose em crianças se dá através da reidratação oral a fim de corrigir a perda de fluidos e eletrólitos. Entretanto, a Shigelose em alguns casos pode se tornar severa em crianças, nestes casos a terapia antibiótica adequada pode encurtar a duração dos sintomas clínicos e a excreção fecal do patógeno (ASHKENAZI, 2004). No entanto, a crescente resistência antimicrobiana de *Shigella* mundial constitui um grande problema.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que uma maior atenção deve ser dada as condições higiênico-sanitárias de escolas e creches do RS, uma vez que, *Shigella* foi isolada a partir das fezes de crianças menores de cinco anos em 40,7% dos casos analisados no presente trabalho. Além disso, o conhecimento dos padrões locais de resistência a antimicrobianos bem como o conhecimento dos padrões de resistência de outras partes do mundo é de extrema importância para a orientação e determinação terapia antimicrobiana mais eficiente para pacientes com diarreia (JUMAA; NERINGER, 2005). Para conhecer estes padrões, é preciso mapear o perfil de sensibilidade dos organismos que atingem hospitais e a população (BRASIL, 2005).

Em nosso estudo a caracterização de *Shigella* responsável por surtos alimentares foi realizada através de resistência a antimicrobianos e PCR-ribotipificação. Por volta da década de 80, as técnicas moleculares começaram a ser utilizadas complementando os métodos fenotípicos utilizados em microbiologia de alimentos para a caracterização de microrganismos (GANDRA, E.A., et al. 2008). Desde então, assim como acontece com outras bactérias, a caracterização da *Shigella* frequentemente tem sido realizada utilizando uma combinação de métodos fenotípicos e genotípicos (LIMA, A.A.et al., 1997; HOE, C.H. et al., 2005; PENATTI, M.P.A., et al. 2007; WEI, HL. et al., 2007).

No presente estudo, foram analisados 152 isolados de *Shigella* quanto à resistência a antimicrobianos. Os isolados provenientes de fezes (n=149) demonstraram altas percentagens de resistência, sendo os maiores percentuais de resistência observados para estreptomicina (88,59 %), ampicilina (84,56 %) e sulfametoxazol-trimetoprim (80,53 %). Além disso, entre os isolados a maior resistência intermediária observada foi para canamicina (61,74 %). Padrões de resistência similares também foram observados em países como Costa Rica (MORA; SOTO; SALVADOR, 2003), Índia (PAZHANI, G. P. et al, 2005) e Irã (SAVADKOOHI; KACHO, 2007). No Brasil, resultados semelhantes foram relatados recentemente por Silva et al. (2008). Neste estudo, os pesquisadores encontraram altas taxas de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e à ampicilina analisando *Shigella* spp. isoladas em um hospital público de Rondônia.

Anteriormente, vários agentes antimicrobianos eram considerados eficazes no tratamento da Shigelose, porém as opções para o tratamento desta doença estão cada vez mais limitadas, devido ao aparecimento de cepas multi-resistentes de *Shigella* (SIVAPALASINGAM, S. et al.,2006). A resistência aos antimicrobianos tem dificultado a seleção do agente para o tratamento da Shigeloses, especialmente em crianças. Durante as últimas décadas, cepas de *Shigella* spp. tem se tornado progressivamente resistente à maioria dos antimicrobianos mais baratos e mais utilizados que anteriormente constituíam a terapia considerada de primeira linha (SACK, R. B. et al., 1997; TJANIADI, P., et al., 2003). A ampicilina e o sulfametoxazol/trimetoprim, inicialmente consideradas como drogas altamente eficazes, atualmente vem se tornando ineficazes diante da emergente resistência *Shigella* frente elas. Nos casos em que a resistência à ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim é comum, os agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento da Shigelose são as fluoroquinolonas, sobretudo a ciprofloxacina (HEYMANN, 2004; WHO 2005). Embora vários estudos tenham descrito eficácia das fluoroquinolonas no tratamento de curto prazo em crianças (PHAVICHITR; SMITH, 2003; LEIBOVITZ, 2004) o uso de cefalosporinas tem sido recomendado para as crianças em vez de ciprofloxacina (CHEASTY; DAY; THRELFALL, 2004).

Nossos resultados também demonstraram que 96,64% dos isolados foram susceptíveis a ciprofloxacina, 89,26% ao ácido nalidíxico e 83,22 % à gentamicina. Estes resultados também estão de acordo com o que foi observado por outros pesquisadores brasileiros e de países como Costa Rica, Nepal e Estados Unidos (SIDRIM, J. J. C., et al., 1998, MORA; SOTO; SALVADOR, 2003, WILSON, G., et al,

2005; SIVAPALASINGAM, S., et al., 2006), demonstrando que apesar das altas taxas de resistência observada entre os isolados de *Shigella* analisados, algumas alternativas ainda podem ser eficientes.

Analisando os resultados dos antibiogramas, pode-se verificar também que, apesar da *S. flexneri* da *S. sonnei* apresentarem altas percentagens de resistência em comum para a estreptomicina e o sulfametoxazol-trimetoprima, quando analisadas separadamente, perceberam-se diferenças em relação a outros antimicrobianos. Enquanto a *S. flexneri* apresentou altas percentagens de resistência à tetraciclina (79,25 %) e ao cloranfenicol (73,6 %) a maior parte das *S. sonnei* mostrou-se sensível as mesmas drogas (3,13 % e 6,25 %, respectivamente). De acordo com o National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS), diferenças semelhantes foram observadas nos Estados Unidos, em 2005 (CDC, 2008).

Apesar do pequeno número de isolados de alimentos analisados (n=3), comparando os seus padrões de resistência com os obtidos para os isolados de fezes, foi possível observar que os isolados de alimentos foram mais susceptíveis aos antimicrobianos testados.

No Brasil, Sidrim et al. (1998) analisaram 26 amostras de *S. flexneri* (todas resistentes a três ou mais antimicrobianos), isoladas no período de 1989 a 1993, a fim de estudar o mecanismo molecular que mediava a multi-resistência. Estas amostras foram submetidas a teste de sensibilidade a antimicrobianos, experimentos de conjugação e extração de plasmídeos. Das 26 amostras de *S. flexneri* doadoras submetidas ao processo de conjugação, 34,6% apresentaram uma frequência variável de transconjugantes. Das amostras que conjugaram, 100% transferiram o fator de resistência relacionado à ampicilina; sendo que em todas as transconjugantes foi evidenciado apenas um plasmídeo de mesmo peso molecular comum às amostras de *S. flexneri*, provavelmente, provenientes dos componentes da microbiota intestinal levando a crer que a pressão seletiva dos antimicrobianos nas populações do intestino teria selecionado amostras bacterianas resistentes. Isto talvez explique o fato de que no presente trabalho o mais resistente dos isolados a partir de alimentos apresentou apenas resistência à gentamicina e resistência intermediária à tetraciclina e ao cloranfenicol, enquanto os isolados a partir de amostras de fezes apresentaram diversos padrões de resistência. No entanto, para confirmar a maior resistência dos isolados fecais, um número maior de amostras isoladas de alimentos teria que ser analisado para descartar a hipótese de que essa

maior sensibilidade entre os isolados de alimentos tenha sido um fato casual destas cepas.

Entre as 152 amostras de *Shigella* analisadas, foram observados 73 perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo que a resistência múltipla foi verificada em 90,19 % dos isolados. Destes, 82,23 % apresentaram resistência a, pelo menos, três antimicrobianos. Seis perfis de resistência (A, B, C, D, E e F) foram considerados mais expressivos, uma vez que agruparam mais de quatro isolados. Os isolados a partir de alimentos, como foi dito anteriormente, demonstraram resistência apenas à gentamicina e resistência intermediária ao cloranfenicol, a tetraciclina e ao sulfametoxazol-trimetoprima. Cada um dos isolados foi classificado em um perfil, demonstrando alta variabilidade de perfis fenotípicos entre eles.

O perfil A caracterizado pela resistência à ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e resistência intermediária à kanamicina agrupou 23,68% dos isolados (n=36). O perfil B agrupou 5,92% dos isolados (n=9) e difere-se do perfil A apenas pela sensibilidade ao cloranfenicol. Os perfis C e D agruparam cinco isolados cada. Cabe ressaltar que os perfis A, B, C e D agruparam apenas isolados de *S. flexneri*, enquanto o perfil E, agrupou cinco isolados de *S. sonnei*. Os demais isolados (n=85) foram agrupados em 65 perfis e representaram 55,92% dos isolados testados. Entre os isolados os mais multi-resistentes foram duas cepas de *S. flexneri* resistentes a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, canamicina e gentamicina, agrupadas no perfil N, uma cepa de *S. flexneri* (perfil M) que se diferenciou do perfil N apenas pela sensibilidade a gentamicina.

Shigella é conhecida por sua característica multi-resistência, que vem resistência vem sendo adquirida progressivamente (SOW, G. A., et al., 2006). Entretanto, o uso indiscriminado destas drogas pode possibilitar o surgimento de microrganismos ainda mais resistentes, reduzindo a eficácia dos medicamentos, fazendo com que as internações tornem-se mais longas, tornando necessário uso de drogas mais caras e mais tóxicas. Nos países menos desenvolvidos onde os antimicrobianos são freqüentemente ministrados sem prescrição médica o surgimento de cepas multi-resistentes também pode resultar num aumento da mortalidade. Em vista disso, estudos regulares precisariam ser realizados em todos os países, com o intuito de monitorar a resistência aos antimicrobianos e contribuir com o controle dos efeitos da Shigelose (DROMIGNY, J. A., et al., 2004; MORALEZ, A. J. R., et al., 2005). Os resultados obtidos no presente estudo reforçam esta

necessidade do monitoramento contínuo da suscetibilidade das *Shigella* a fim de obter informações essenciais para o tratamento e também para o controle efetivo das Shigeloses no Brasil.

O diagnóstico rápido do agente etiológico em caso de surtos é sempre muito importante, entretanto, os métodos convencionais em geral são bastante demorados. Entre as técnicas moleculares disponíveis atualmente, a PCR-Ribotipificação pode ser utilizada em estudos epidemiológicos, uma vez que é capaz de diferenciar rapidamente bactérias gram negativas como a *Salmonella* de outras do mesmo grupo (JAMIL, M., et al., 2007) como a *Shigella*, por exemplo. Em 2003, Geimba et al. consideraram a técnica de PCR-Ribotipificação bastante reprodutível, e apropriada para a tipificação de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares do RS. Oliveira et al. (2005) também destacaram a adequação e a boa reprodutibilidade da PCR-Ribotipificação na caracterização molecular de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em surtos, além do custo relativamente baixo de execução dessa técnica.

No presente estudo PCR-Ribotipificação foi capaz de discriminar espécies de *Shigella* de outros gêneros bacterianos a partir de amostras contendo DNA de *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, e *Salmonella* Enteritidis 3091/05, quando analisados produziram padrões de bandas distintos. Não foi possível diferenciar as espécies *Shigella* de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* O157: H7, uma vez que os padrões de bandas de DNA foram idênticos. De acordo com Coimbra et al. (2001) *Shigella* spp. (exceto *S. boydii* sorotipo 13) e *Escherichia coli* constituem um único grupo, e apresentam DNA similares. Generalizando, pode-se dizer que as quatro espécies de *Shigella* podem ser consideradas como clones da *E. coli*, porém estas são bioquimicamente menos ativas, apresentam hospedeiro estrito, e possuem um plasmídeo mediando os mecanismos de invasão. Segundo Parsot (2005), bactérias enteroinvasivas como a *Shigella* spp. e a *E. coli* (EIEC) são responsáveis por Shigeloses em seres humanos .

Das 152 (149 fezes isolados 3 alimentos isolados) amostras de *Shigella* isoladas submetidas a PCR-Ribotipificação três padrões de bandas foram identificados e denominados como SH1, SH2, SH3. Perfil SH1 foi composto por apenas por *S. flexneri* (n=116) apresentou duas bandas (480 e 570bp). Perfil SH2 foi composto por cepas de *S. sonnei* (n=36) apresentou de três bandas (350, 480 e 570pb), enquanto o perfil SH3 foi composto apenas pela cepa de *S. dysenteriae* (n=1) isolada a partir de fezes em 2006, e apresentou duas bandas, mas com

diferentes pesos moleculares em relação ao padrão SH1 (570, e 700pb). A banda de 570pb foi detectada em todas as cepas de *Shigella* analisadas.

Com base no que se sabe atualmente, são muitas as dificuldades na diferenciação de *Salmonella* e *Shigella* a partir de métodos convencionais. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a PCR-Ribotipificação foi capaz de diferenciar as espécies *Shigella* envolvidas em surtos de Shigelose da *S. Enteritidis* 3091/05. Esta cepa de *Salmonella* apresenta o mesmo padrão genotípico da *S. Enteritidis* SE86, principal agente causador de surtos alimentares investigados no Estado do RS, nos últimos anos (OLIVEIRA, F. A., et al., 2008). Além disso, a amplificação por PCR da região entre as seqüências conservadas 16S e 23S do operon do RNA ribossômico (RNAr), provou ser útil para a diferenciação entre espécies de bactérias (De CESARE, A., et al., 2001). Em 2007, Jamil et al. utilizando um único conjunto primers para PCR-Ribotipificação, concluíram que a PCR-Ribotipificação pode diferenciar bactérias gram-negativas consideradas patogênicas para humanos. A PCR-Ribotipificação apresenta ainda algumas vantagens quando comparada a outros métodos moleculares, principalmente por não ser uma técnica cara e porque resultado o pode ser obtido em 24h, enquanto técnicas laboratoriais tradicionais levam em média 5 dias até que se obtenha algum resultado. Por exemplo, muitos relatos têm sido feitos sobre a caracterização de *Shigella* através do PFGE, técnica apontada como muito discriminatória e considerada o "padrão ouro" para a tipificação de microrganismos (GEIMBA, M.P., et al., 2003, FLÓREZ, A. J., et al. 2005). No entanto, o PFGE é uma técnica exigente e dispendiosa, o que dificulta a implementação deste método especialmente em laboratórios de saúde pública. Uma vez que no presente trabalho a PCR-Ribotipificação foi capaz de diferenciar as amostras de *Shigella* da *Salmonella*, microrganismo de grande importância em termos de saúde pública no Estado pode-se concluir que a PCR-Ribotipificação poderia ser bastante útil na investigação de rotina de surtos alimentares.

Dos 149 isolados a partir de fezes analisados neste trabalho, dez foram classificados pelo setor de bacteriologia do FEPPS/IPB/LACEN/RS apenas como *Shigella* spp. Quando submetidos a PCR-Ribotipificação, estes isolados apresentaram padrões de bandas semelhantes, ou seja, duas amostras apresentavam um padrão de bandas semelhante ao padrão SH2 e oito amostras um padrão semelhante ao padrão SH1. Estes isolados foram submetidos à sorotipificação, e esta confirmou que se tratava de dois isolados de *S. sonnei*

(padrão SH2), e oito isolados de *S. flexneri* (padrão SH1), sugerindo que a PCR-Ribotipificação também pode contribuir para a identificação de espécies de *Shigella* que não foram identificados em nível de espécie pela bacteriologia do FEPPS/LACEN/RS.

Os resultados demonstraram ainda que várias cepas envolvidas em diferentes focos Shigelose apresentaram o mesmo padrão de bandas na PCR-Ribotipificação e também o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos, sugerindo que a mesma cepa de *Shigella* está presente em diversas localidades do RS. De acordo com Navia e Gasco'n (2005), a maioria dos surtos ou casos de Shigelose ocorre devido à propagação clonal de uma ou algumas cepas. No entanto, ao contrário do que era esperado, apesar dos métodos de caracterização molecular serem considerados mais sensíveis e com maior poder de discriminação a PCR-Ribotipificação identificou menos perfis do que os obtidos através da resistência aos antimicrobianos entre as cepas de *Shigella* analisadas. Esse fato demonstra a necessidade da utilização de no mínimo dois métodos combinados na caracterização de *Shigella*, sugere ainda que a variabilidade genotípica das regiões espaçadoras hipervariáveis entre os genes 16S e 23S analisadas são mais conservadas enquanto a variabilidade fenotípica desse microrganismo é mais susceptível a pressões seletivas do meio. Além disso, a resistência antimicrobiana em microrganismos como a *Shigella* poder ser mediada através de plasmídeos, DNA transmissível ou outros elementos, em vista disso, outros métodos de tipificação molecular poderiam ser aplicados para verificar relação clonal das cepas de *Shigella* isoladas no Estado.

De modo geral, os resultados obtidos no presente estudo indicam a necessidade do monitoramento contínuo da resistência das *Shigella*, sugerem ainda, que a PCR-Ribotipificação poderia ser bastante útil na rotina de investigação de surtos alimentares a fim de obter informações essenciais para o tratamento e também para o controle efetivo das Shigeloses no Brasil.

REFERÊNCIAS

AMSON, G. V. et al., levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

ASHKENAZI, S. *Shigella* infections in children: new insights. **Semin Pediatr Infect Dis** 15:246-252, 2004.

BAUDART, J., et al. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.1544 -1552, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lançado projeto para prevenir resistência aos antibióticos. **Notícias da Anvisa: Diário e Mensal**, Brasília, 22 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/220705.htm>>. Acesso em: 17 maio de 2006.

BRASIL. Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 02 de jan. 2001. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 17 maio de 2007.

CARMO, G.M.I. et al. (2005). *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004*. Boletim eletrônico epidemiológico, Brasília. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf >

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC], 2003. **PHLIS surveillance data. Shigella: annual summary, 2003**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/shigella.htm>. Acesso em 06 Jan. 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC], 2005.

Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 Sites, United States, 2004. Morbidity and Mortality Weekly Report 54, 352-356.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2005.** Department of Health and Human Services, CDC. 2008.

CHEASTY, T., DAY, M., THRELFALL, E.J. Increasing incidence of resistance to nalidixic acid in *Shigella* from humans in England and Wales: implications for therapy. **Clinical Microbiology and Infection.** V.10, pg.1033–1035. 2004.

COIMBRA, R. S. et al. Computer identification of *Shigella* species by rRNA gene restriction patterns. **Research in Microbiology.** V. 152, pg. 47–55, 2001.

CHUANG, Y.Y.; HUANG, Y.C.; LIN, S.Y. Outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis in Northeastern Taiwan. **The Pediatric Infect Disease Journal.** 25, 92-4, 2006.

De CESARE, A., et al. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology.**91, 780-785. 2001.

DROMIGNY, J. A., et al. The distribution and antibiotic susceptibility of *Shigella* isolates in Dakar, Senegal (2000–2002) **International Journal of Antimicrobial Agents.** Vol. 24, pg. 109–110, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com> > Acesso em: jun. abril 2007.

DUBOIS, V.; et al. High Genetic Stability of Integrons in Clinical Isolates of *Shigella* spp. of Worldwide Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** . 51 (4), 1333–1340. 2007.

FARBER, J.M. et al. Molecular typing and differentiation. In: FARBER, J.M. et al. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C.: APHA, 2001. cap. 11, p. 127-158.

FLÓREZ, A. J. et al. Outbreak of *Shigella sonnei* in a rural hotel in La Gomera, Canary Islands, Spain. **International Microbiology**. v. 8, pg.133-136, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.isciii.es/pdf/im/v8n2/08%20AlcobaFlorez.pdf>>. Acesso em: 12 de junho de 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8th Ed. Airlington: AOAC International, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-6.html>> Acesso em: 19 de junho de 2007.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo; Atheneu, 2005.

FULLÁ N., et al. Surveillance for antimicrobial resistance profiles among *Shigella* species isolated from a semirural community in the northern administrative area of Santiago, Chile. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.6, pg. 851–854, 2005. Disponível em: < <http://www.ajtmh.org/cgi/reprint/72/6/851.pdf>>. Acesso em: 12 de junho de 2007.

GANDRA, E.A., et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol**. Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GEIMBA, M.P. et al. Characterization by antimicrobial resistance, plasmid profile, PCR-ribotyping and PFGE of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in south of Brazil, 1999-2000. In: ASM COFERENCES. **Salmonella**: Pathogenesis, Epidemiology, and Vaccine Development, Washington: American Society for Microbiology, 2003. p. 58-59.

GEMMEL, C.G., 1999. Where is typing going? J. Hosp. Infect. 43, S89–S92.

Surdeanu, M., Ciudin, L., Pencu, E., Straut, M., 2003. Comparative study of three different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. **European Journal of Epidemiology**.18, 703– 710.

HAIMOVICH, B. e VENKATESAN, M. M. *Shigella* and *Salmonella*: death as a means of survival. **Microbes and Infection**, Paris. v. 8, p. 568–577, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em: set. 2006.

HAMILTON-WEST, M. C. et al. Epidemiología clínica y molecular de las infecciones por *Shigella* spp en niños de la Región Metropolitana durante el verano 2004-2005. **Rev Méd Chile**. 135: 1388-1396, 2007.

HEYMANN DL. Control of Communicable Diseases Manual, 18th edn. Washington, DC: APHA, 2004, pp. 700

HOE, C.H. et al. Antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis of *Shigella sonnei* strains in Malaysia (1997–2000). **Journal of Applied Microbiology** 2005, 99, 133–140

HYETT, A. P., BRAZIER, J. S. & O'NEIL, G. L. Pulsed-field gel electrophoresis as a method for typing *Clostridium difficile* in the routine laboratory. **Rev Med Microbiol 8 (Suppl.)**, 63–64, 1997.

JAMIL, M., et al. Differentiation of common gram negative pathogens by PCR-Ribotyping. *Pak. Journal of The Medical Sciences* 23 (2), 233-237, 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JONSSON, J. et al. Late detection of a Shigellosis outbreak in a school in Madrid **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, França, v. 10, n.10–12, 2005. Disponível em: <www.eurosurveillance.org>. Acesso em: 18 maio 2007.

JUMAA PA, NERINGER R. A survey of antimicrobial resistance in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates. **Journal of chemotherapy** . Firenze vol. 17, nº4, pp. 376-379 2005;

Kato, H., et al. Relapses or reinfections: analysis of a case of *Clostridium difficile*-associated colitis by two typing systems. **Current Opinion Microbiology** 33, 220–223,1996.

KOTLOFF, K.L., et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. World Health Organ.** 77, 651- 666, 1999.

Kuo, CY.; et al. Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolates in eight Asian countries, 2001-2004. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection.** 41,107-111, 2008.

LEIBOVITZ E. The use of fluoroquinolones in children. *Current Opinion in Pediatrics* 2006; 18: 64–70.

LIMA, A.A. et al. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology.** V. 35, N. 5, pg.1061-1065, 1997.

LINDQVIST, R. Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method – sensitivity and performance compared with a conventional culture method. **Journal of Applied Microbiology.** V. 86, 971–978, 1999.

Litwin, C.M., et al. Characterization of endemic strains of *Shigella sonnei* by use of plasmid DNA analysis and pulsed field electrophoresis to detect patterns of transmission. **The Journal of Infectious Diseases.** 175, 864–870, 1997.

MacCANNELL, D. R., et al. Molecular Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Isolates from Eastern and Western Canada. **Journal of Clinical Microbiology.** Vol. 44, N. 6 pg. 2147–2152, 2006.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Vol.5, pg. 607-625, 1999.

MENDOZA, M.C., MARTIN, M.C., HEVIA, M.A.G. Usefulness of ribotyping in a molecular epidemiology study of shigellosis. **Epidemiology and Infection.** V.116, pg. 127–135, 1996.

MILLEMANN, Y. et al. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype *Typhimurium* bovine isolates from farm to meat. **Journal Clinical Microbiology**, Washington , v.38, p.2204-2209, 2000.

MIYAGI, K. et al. Frequency of failure to isolate *Shigella* spp. by the direct plating technique and improvement of isolation by Inrichment in selenite broth. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, Vol. 127, pg. 375-379. Cambridge, 2001.

MORA, M. M.; SOTO, L.; SALVADOR, G. Diarreas asociadas a *Shigella* con un patrón de resistencia antimicrobiana alto en el cantón de Coto Brus, Costa Rica. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**. v.24 n.1-2 San José, 2003.

MORALES, R. J. A., et al. *Salmonella* and *Shigella* Antimicrobial Resistance Patterns in a General Hospital of Caracas, Venezuela 1997-2003. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 26, 2005.

MORERA, M.A., et al. Brote epidémico de shigelosis por ingesta de agua. **Enferm Infec Microbiology Clinical**. V. 13, n. 3, pg. 160-165, 1995.

MUTLU, E., et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. **Journal of Medical Microbiology**. V.56, 921–929,2007.

Navia, M.M.; Gasco'n. V. J. (2005). Genetic diversity of *Shigella* species from different intercontinental sources. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 5, pg. 349–353, 2005.

Navia, M.M., et al. Typing and characterization of the mechanisms of resistance of *Shigella* spp. Isolated from feces of children under five years of age from Ifakara, Tanzania. **Journal of Clinical Microbiology**. 37, 3113–3117, 1999.

OLIVEIRA, F. A. **Caracterização por suscetibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e**

2002. 2005, 85f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Oliveira, F. A. de ; Geimba, M. P. ; Brandelli, A. ; Silva, W. P. ; Pasquali, G. ; Tondo, E. C. Clonal relationship among *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Food Control.** (2008). Available at: www.sciencedirect.com

PARSOT C. *Shigella* spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors **FEMS Microbiology Letters.** v. 252, pg. 11–18, 2005.

PEIRANO,G., SOUZA, F. S. E RODRIGUES, D. P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 101, pg. 245-250, Maio 2006.

PENATTI, M.P.A. 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,** 2007. < <http://www.sciencedirect.com> > Acesso em: set. 2006.

PAZHANI, G. P. et al. Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India. **Epidemiology and Infection.** V. 133, 1089–109, 2005.

PHAVICHITR, N; SMITH, A.G. C.Acute gastroenteritis in children : what role for antibacterials ? **Pediatric Drugs.** 5: 279–290, 2003.

RIBEIRO, R. V. *Shigella*: aspectos gerais, clínicos e epidemiológicos.

Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária / SCZ. Boletim de Divulgação Técnica e Científica. Secretaria Municipal de Saúde SMS. Rio de Janeiro. Ano 2, n. 07, julho de 2000. Disponível em: <<http://www.ccs.saude.gov.br/visa/publicacoes/arquivos/bol7.pdf>> . Acesso em: 09 de março de 2007.

SAVADKOOHI, R. B. e KACHO A. M. Prevalence of *Shigella* Species and Their Antimicrobial Resistance Patterns at Amirkola Children's Hospital, North of Iran. **Iran Journal Pediatric**, V. 17 n. 2, pg.118-122, Jun. 2007. Disponível em: <<http://diglib.tums.ac.ir/pub/magmng/pdf/3491.pdf>>. Acesso em: 12 de junho de 23007.

SACK R B; RAHMAN M; YUNUS M; KHAN E H. **Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease**. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 1997; 24 Suppl (1):S102-5.

Silva, T.; et. al. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz**. 103(7), 731-733, 2008.

SIDRIM, J. J. C. et al. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 31, pg. 263-270, maio-junho, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v31n3/0583.pdf>. Acesso em: 16 de junho de 2007.

SIVAPALASINGAM, S. et al. High Prevalence of Antimicrobial Resistance among *Shigella* Isolates in the United States Tested by the National antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 50 (1), 49–54, 2006.

SOW, G. A., et al. Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 267–270, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com> > Acesso em: set. 2006.

SPIGAGLIA, P., et al. Molecular typing and long-term comparison of *Clostridium difficile* strains by pulsed-field gel electrophoresis and PCR-ribotyping. **Journal of Medical Microbiology**. V.50, n.5 pg. 407-414, 2001.

TERHES, G. et al., Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. **Journal of Medical Microbiology**. 55, 279–282, 2006.

TJANIADI, P., et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 68, n.6, pg. 666–670, 2003.

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 Clinical Microbiology**. 2004 42: 2031-2035

THONG, K. L. et al. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. **BMC Infectious Diseases** 5:8, 2005. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/8>> Acesso em janeiro de 2009.

WARREN, B. R., PARISH B; A. e M. E. SCHNEIDER. K. R. *Shigella* as a Foodborne Pathogen and Current Methods for Detection in Food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Volume 46, Pg. 551 – 567, 2006.

WEI, HL., et al. Epidemiology and evolution of genotype and antimicrobial resistance of an imported *Shigella Sonnei* clone circulating in central Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** (2007). Available at: www.sciencedirect.com

WILSON, G. et al. Isolation & antimicrobial susceptibility of *Shigella* from patients with acute gastroenteritis in western Nepal. **Indian Journal of Medical Research**. 123, pp 145-150, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the control of Shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1.** , Geneve, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/documents/Guidelines_Shigellosis.pdf>. Acesso em: 24 de maio de 2007.

WU, F.M., et al. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, pg.568-572, 2000.