

CAPÍTULO 1

PLASMÍDIOS CONJUGATIVOS ISOLADOS DO ENTEROPATÓGENO *Shigella sonnei* CODIFICAM SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Data de aceite: 28/09/2022

Jaqueline Silvana Moreira

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios,
Departamento de Microbiologia, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
<http://lattes.cnpq.br/6047605045111426>

Jamil Silvano de Oliveira

Laboratório de Sinalização Celular e
Nanobiotecnologia, Departamento de
Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, MG. Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9091111327326713>

Desielle de Matos Clementino

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios,
Departamento de Microbiologia, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
<http://lattes.cnpq.br/4303281638405890>

Paula Prazeres Magalhães

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios,
Departamento de Microbiologia, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
<http://lattes.cnpq.br/2184773662680617>

Luiz de Macêdo Farias

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios,
Departamento de Microbiologia, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
<http://lattes.cnpq.br/3041207015099007>

RESUMO: *Shigella*, um enteropatógeno invasivo, é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose, doença diarreica grave que acomete, principalmente, crianças de países subdesenvolvidos. A bactéria expressa diversos fatores de virulência, inclusive, substâncias antagonistas e resistência aos antimicrobianos. Estas substâncias são codificadas, frequentemente, por genes plasmidiais, que podem ser transferidos por processos de recombinação, como conjugação bacteriana. O presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar se a resistência aos antimicrobianos e a(s) substância(s) antagonista(s) sintetizadas por *Shigella sonnei* SS9 são codificadas por genes plasmidiais. Como reveladora da expressão antagonista e receptora dos plasmídios, foram empregadas as amostras *S. sonnei* SS12 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente. Para o ensaio de conjugação SS9 e *E. coli* foram avaliadas quanto aos seus perfis de suscetibilidade a antimicrobianos. Após seleção do antimicrobiano, SS9 e *E. coli* foram cultivadas separadamente, as culturas ajustadas em escala *McFarland 0,5* e *diluídas 1:50*. Uma alíquota de cada amostra foi adicionada a um mesmo tubo e o material foi incubado. Em intervalos de tempos pré-determinados, alíquotas foram cultivadas em MacConkey Agar com e sem antimicrobiano. Colônias lac⁺ foram avaliadas quanto à expressão de antagonismo. Colônias positivas foram submetidas a extração plasmidial e análise por eletroforese. Após o cultivo de uma amostra transconjugante, o material foi centrifugado e o sobrenadante analisado pelo ensaio antagonista. Análise da curva de crescimento do

transconjugante com síntese de substância(s) bioativa(s) também foi realizada. Os resultados demonstram que a amostra transconjugante passou a albergar plasmídios conjugativos com presença de genes que codificam resistência aos antimicrobianos ampicilina e trimetropima além da produção de substância(s) antagonista(s). Comprovando a presença de fatores de virulência, que podem ser transferidos por conjugação, a partir do enteropatógeno *S. sonnei*, que foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde como um dos doze patógenos que necessitam, com urgência, do desenvolvimento de novos fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: *Shigella sonnei*, substância antagonista, enteropatógenos, conjugação bacteriana, resistência antimicrobiana.

CONJUGATIVE PLASMIDS ISOLATED FROM THE ENTEROPATOGEN *Shigella sonnei* CODE ANTAGONIST SUBSTANCE(S) AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE

ABSTRACT: *Shigella*, an invasive enteropathogen, is responsible for bacillary dysentery or shigellosis, a severe diarrheal disease that mainly affects children in underdeveloped countries. The bacterium expresses several virulence factors, including antagonistic substances and antimicrobial resistance. These substances are often encoded by plasmid genes, which can be transferred by recombination processes, such as bacterial conjugation. The present study was carried out to determine whether antimicrobial resistance and antagonist substance(s) synthesized by *S. sonnei* SS9 are encoded by plasmid genes. As a developer of plasmid antagonist and receptor expression, samples *S. sonnei* SS12 and *E. coli* ATCC 25922, respectively, were used. For the SS9 and *E. coli* conjugation assay they were evaluated for their antimicrobial susceptibility profiles. After antimicrobial selection, SS9 and *E. coli* were grown, separately, cultures adjusted to McFarland 0.5 scale and diluted 1:50. An aliquot of each sample was added to the same tube and the material was incubated. At predetermined time intervals, aliquots were cultured on MacConkey Agar with and without antimicrobial. Lac+ colonies were evaluated for antagonism expression. Positive colonies were subjected to plasmid extraction and electrophoresis analysis. After culturing a transconjugant sample, the material was centrifuged and the supernatant analyzed by the antagonist assay. Growth curve analysis of the transconjugant with synthesis of bioactive substance(s) was also performed. The results show that the transconjugant sample started to harbor conjugative plasmids with the presence of genes that encode resistance to the antimicrobials ampicillin and trimethopine, in addition to the production of antagonist substance(s). Proving the presence of virulence factors, which can be transferred by conjugation, from the enteropathogen *S. sonnei*, which was recognized by the World Health Organization as one of the twelve pathogens that, urgently, need the development of new drugs.

KEYWORDS: *Shigella sonnei*, antagonist substance, enteropathogens, bacterial conjugation, antimicrobial resistance.

1 | INTRODUÇÃO

Pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Shigella* é constituído por bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não capsulados e incapazes

de fermentar a lactose [11; 16; 20; 22; 28]. As quatro espécies do gênero, podem ser distinguidas com base em provas bioquímicas e sorológicas em *S. sonnei* (1 sorotipo), *S. flexneri* (18 sorotipos), *S. dysenteriae* (15 sorotipos) e *S. boydii* (20 sorotipos) [10].

Shigella spp. é o agente etiológico da shigelose, que têm os seres humanos como único reservatório conhecido [29]. A bactéria apresenta padrão de disseminação mundial, com cerca de 188 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 164 mil óbitos/ano, a maioria, crianças [9]. A transmissão ocorre, principalmente, pela rota fecal-oral, via ingestão de água e alimentos contaminados, mas também é observada a transmissão via *fômites*, moscas e contato sexual [29]. Sendo necessárias de 10 a 100 células bacterianas para o desenvolvimento da doença [7]. Que manifesta-se pela ocorrência de febre superior a 38 °C, cólicas abdominais e eliminação de fezes mucossanguinolentas, com presença do patógeno viável por algumas semanas [29]. Formas mais graves de apresentação incluem vômitos, anorexia e formação de abscessos e ulcerações na mucosa. Em alguns casos, são relatados mais de 20 episódios evacuatórios por dia [1; 6; 13; 15; 16; 20; 26].

Pacientes que apresentam formas moderadas de shigelose podem ser tratados com hidratação por via oral e alimentação balanceada. Entretanto, recomenda-se antibioticoterapia, com o intuito de se reduzir a duração e a gravidade do quadro, além de limitar a disseminação da bactéria [12; 17; 21].

Resistência a fármacos antimicrobianos, até mesmo perfil *multi-drug resistant* (MDR) e *extensively drug-resistant* (XDR), vem sendo descritos para *Shigella* spp. Inclusive, de modo preocupante, no último ano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi notificada da ocorrência de elevados casos de Shigelose causada por *S. sonnei* (XDR) em diversos países como Reino Unido e Grã-Bretanha. O que desperta preocupação, devido à baixa disponibilidade de fármacos ativos capazes de controlar a disseminação e a gravidade da doença [29]. Para tanto, a OMS incluiu *Shigella* spp. na lista dos doze patógenos que requerem, com urgência, a proposição de novas medidas de tratamento [6].

Substâncias antagonistas, dentre essas peptídios e proteínas antimicrobianas, podem ser codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos. Elas são consideradas componentes de virulência produzidas por bactérias por auxiliar na conquista de um habitat e na competição por nutrientes, uma vez que atuam contra outros microrganismos. No entanto, devido à bioatividade molecular dessas substâncias também despertam grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos podendo contribuir no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, que podem, no futuro, serem uma alternativa no tratamento de algumas doenças, inclusive, Shigelose [23; 25].

Com base no crescente perfil de resistência a múltiplos fármacos, na capacidade de *S. sonnei* produzir substâncias com ação antagonista a outro isolado da mesma espécie e a possibilidade desses genes de resistência e produção de substâncias antagonistas serem codificados por plasmídios conjugativos. O objetivo desse trabalho foi investigar a presença de plasmídios conjugativos presente em um isolado de *S. sonnei*, capazes de contribuir

com a virulência do patógeno, por codificarem a produção de substância(s) antagonista(s) e perfil de resistência aos antimicrobianos.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Duas amostras de *S. sonnei*, (SS9 e SS12) foram utilizadas no estudo como produtora(s) de substância(s) antagonista(s) e reveladora do antagonismo, respectivamente. Elas foram obtidas de amostras fecais de crianças com shigelose atendidas no Hospital Infantil João Paulo II, Belo Horizonte, Brasil [24]. Para a escolha da amostra receptora empregada no ensaio de conjugação, foi realizado o teste de difusão em sobrecamada, utilizando um painel de três amostras, *E. coli* K12 Row, *E. coli* ATCC 25922 e *S. flexneri* ATCC 12022. Todas as amostras fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e vêm sendo mantidas em caldo Brucella (BBL, Sparks, MD, EUA) adicionado com 10% de glicerol (v/v) a -80°C.

Teste de difusão em sobrecamada

Antes do uso, todas as cepas foram cultivadas por três dias consecutivos em Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Sparks, MD, EUA) a 37 °C, por 24 h, em aerobiose. As amostras foram inoculadas, separadamente, em Tryptic Soy Broth (TSB; Difco), e incubadas nas mesmas condições. A concentração de cada cultura foi ajustada para leitura de 0.08 a 0.10 usando λ de 625 nm [4]. Alíquotas das amostras foram analisadas como produtoras e reveladoras da ação antagonista (QUA. 1). Para o ensaio, 10 μ L da cultura da possível amostra produtora foi depositada sobre a superfície de TSA e a placa incubada na mesma condição. As células viáveis foram eliminadas pela exposição de vapor ao clorofórmio por 30 min seguido de placa entre aberta, em ambiente estéril, para eliminação do vapor de clorofórmio. A placa foi recoberta com 3.5 mL de TSA semissólido (TSB + 0.7% ágar) contendo 10 μ L da possível amostra reveladora e incubada como descrito acima. A atividade antagonista foi observada pela presença ou ausência de halo de inibição em torno da amostra produtora [3, 8; 18; 19].

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	<i>S. sonnei</i> SS9 ^b	<i>S. sonnei</i> SS12	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>E. coli</i> K12 Row	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>E. coli</i> K12 Row ^a	T ^c	T	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	T	T	NT	NT	NT
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	T	T	NT	NT	NT
<i>S. sonnei</i> SS9	NT ^d	CP ^e	T	T	T

^a, amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; ^b, amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; ^c, teste realizado; ^d, não testado; ^e, controle positivo.

Quadro 1: Avaliação da atividade antagonista e suscetibilidade celular frente à substância antagonista para seleção de uma amostra receptora para teste de conjugação.

Antibiograma

As amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922 foram empregadas no ensaio de antibiograma pelo método de disco difusão. *E. coli* ATCC 25922 é recomendada, pelo CLSI 2018, como amostra controle para os ensaios de antibiograma que envolvam membros da família *Enterobacteriaceae*. No presente estudo, ela também foi empregada como candidata à receptora no processo de conjugação. Para o ensaio, foi empregado um painel de 19 fármacos antimicrobianos, das seguintes classes: penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta gerações, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, monobactâmicos, anfenicóis e sulfonamidas. Os discos foram selecionados com base na resistência aos antimicrobianos conferida por plasmídios.

Para o teste, foram dispensados 50 mL de *Mueller Hinton Agar* (Difco)/placa 150x30 mm e, após a solidificação do meio, as amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922, ambas cultivadas em *Mueller-Hinton Broth* (Difco), ajustadas em espectrofotômetro com absorbância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, foram semeadas com o auxílio de *swab*. Os discos antimicrobianos foram depositados na superfície do meio e o material foi incubado a 37 °C, por 16 h, em aerobiose. A leitura foi realizada pela observação macroscópica da presença de halo de inibição e medição, com paquímetro, de cada halo [4; 5].

Conjugação

SS9 foi empregada no ensaio para verificar a capacidade de transferência, por conjugação, de plasmídios que albergam genes codificadores de substância(s) antagonista(s) e de resistência aos antimicrobianos. *E. coli* ATCC 25922 foi avaliada como receptora de tais plasmídios.

As amostras em estudos foram inoculadas em 2 mL de caldo Penassay (Difco) e incubadas por 24 h, sem agitação, em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. As culturas foram

ajustadas em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm, para leitura de 0,08 a 0,10, e diluídas 1:50 v/v, com volume final de 3 mL, no mesmo caldo. Os tubos foram incubados nas mesmas condições acima, por 3 h, sob agitação a 300 rpm. As culturas foram diluídas, no mesmo caldo, na proporção 1:10 v/v. Um volume de 1 mL das culturas das amostras produtora e receptora foram, então, misturadas em tubo de ensaio estéril. As amostras foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. Nos intervalos de tempo 0, 15 e 30 min, 1, 3, 5 e 24 h, alíquotas de 100 µL foram semeadas em MacConkey Agar (Difco) acrescido de ampicilina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) 32 µg/mL. As mesmas amostras foram diluídas 1:10 v/v em Caldo Penassay e 100 µL foram semeados em meio sem antibiótico. Como controle, 100 µL das amostras produtora e receptora foram inoculadas no mesmo meio com e sem ampicilina. As placas foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. A leitura foi realizada pela contagem das colônias lactose positivas (Lac⁺) [27].

Confirmação dos resultados de conjugação e expressão antagonista

Para assegurar a ausência de colônias de *Shigella* nas amostras recuperadas no ensaio de conjugação, as colônias lac⁺ foram estriadas em MacConkey Agar e incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. As colônias de *E. coli* obtidas foram cultivadas em TSA, nas mesmas condições descritas anteriormente. Clones das amostras em estudo foram obtidos usando a técnica de plaqueamento de réplicas [14]. O ensaio de difusão em sobrecamada foi realizado com as amostras de *E. coli* transconjugantes da placa réplica.

Extração plasmidial e eletroforese

Para confirmar o sucesso da conjugação, foi realizado o ensaio de extração plasmidial das amostras *S. sonnei* SS9, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* transconjugante, utilizando-se o kit 96 Well Plasmid Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan). Os produtos obtidos e o padrão de massa molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3 (Fermentas, Life Sciences, Alemanha) foram acrescidos de corante para DNA GelRed™ (Biotium, Houston, TX, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) 0,7% (m/v) preparado com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA). A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão TBE, sob corrente de 75 V, por aproximadamente 2 h e 15 min. Após a corrida, o perfil plasmidial foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Curva de crescimento e teste de atividade antagonista do transconjugante

Com base nos testes de atividade antagonista, pelo teste de difusão em sobrecamada, e perfil eletroforético em gel de agarose 0,7%, a amostra transconjugante 9 foi escolhida para a avaliação da síntese de substância antagonista em relação ao tempo de cultivo. A amostra escolhida foi cultivada em TSA, a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Colônias obtidas foram transferidas para caldo TSB e incubadas nas mesmas condições, por 12 h. A cultura foi ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, fracionada em tubos pré-identificados e incubada. Em seguida, a amostra do tubo 1 foi submetida a leitura da densidade óptica, uma alíquota da cultura foi centrifugada e o

sobrenadante avaliado pelo teste de difusão em sobrecamada e titulação [18]. Uma outra alíquota foi diluída em salina 0,85%, 100 μL da diluição 10^{-9} foi plaqueada, em duplicata, em meio TSA e incubadas. Os mesmos passos foram realizados para os demais tubos, respeitando o intervalo de tempo, 20 min entre cada tubo, por 9 h. A leitura da curva de crescimento foi realizada pela contagem do número de colônias em relação ao tempo e a síntese de composto(s) antagonista(s) foi determinada durante a curva de crescimento bacteriano.

Titulação da substância antagonista

Os tubos obtidos do ensaio de curva de crescimento e produção de substância antagonista foram submetidos a diluições seriadas em água ultrapura e 10 μL de cada diluição foram depositados sobre camada de TSA. Após exposição a vapor de clorofórmio e evaporação do clorofórmio residual, por 30 min cada, teste de difusão em sobrecamada foram realizados. O título, definido como a recíproca da maior diluição que resulta em um halo límpido de inibição da amostra reveladora, foi determinado. Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA). mL^{-1} , empregando-se a fórmula “UA = título x 1000 $\mu\text{L}/\text{V}(\mu\text{L})$ [2; 8; 18; 19].

3 | RESULTADO

Escolha da amostra receptora para o ensaio de conjugação

Com base no ensaio de difusão em sobrecamada, para a avaliação da ação antagonista, *E. coli* ATCC 25922 foi escolhida como receptora para o teste de conjugação. A amostra não foi ativa contra *S. sonnei* SS9 e *S. sonnei* SS12 e também não foi inibida por *S. sonnei* SS9 (TAB. 1). A escolha da amostra receptora é um passo importante para a pesquisa de plasmídios conjugativos que possam codificar a produção de substância(s) antagonista(s), e resistência antimicrobiana aos fármacos.

Antibiograma

A análise fenotípica, por antibiograma, evidenciou a resistência de *S. sonnei* SS9 aos antimicrobianos trimetoprima e ampicilina, enquanto que *E. coli* ATCC 25922 foi suscetível aos mesmos.

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	<i>S. sonnei</i> SS9 ^b	<i>S. sonnei</i> SS12	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>E. coli</i> K12 Row	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>E. coli</i> K12 Row ^a	- ^c	-	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	NT	NT	NT
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	-	+++ ^e	NT	NT	NT
<i>S. sonnei</i> SS9	NT ^f	+++	+ ^d	+++	-

^a, amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; ^b, amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; ^c, ausência de atividade antagonista; ^d, halo de inibição pequeno e nublado; ^e, halo de inibição grande e límpido; ^f, não testado.

Tabela 1: Avaliação da atividade antagonista e suscetibilidade celular frente à substância antagonista para seleção de uma amostra receptora para teste de conjugação.

Conjugação

No ensaio, apenas as colônias de *E. coli*, que são lactose positivas, foram consideradas. A conjugação entre *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922 com transferência do plasmídio que codifica resistência a ampicilina foi observada a partir de 15 min. Isolados de *E. coli* transconjugante selecionados também mostraram resistência a trimetropima. No meio sem antimicrobiano, o número de colônias lac⁺ e lac⁻ foi incontável, o que inviabilizou o emprego deste ensaio.

Atividade antagonista das células transconjugantes

O teste de difusão em sobrecamada para avaliação de expressão antagonista pelas amostras de *E. coli* ATCC 25922 transconjugantes recuperadas do meio com ampicilina apresentou resultado positivo para algumas amostras (FIG. 1). O dado demonstra a transferência horizontal, por conjugação, dos plasmídios que conferem as características fenotípicas de resistência à antibiótico e atividade antagonista contra SS12.

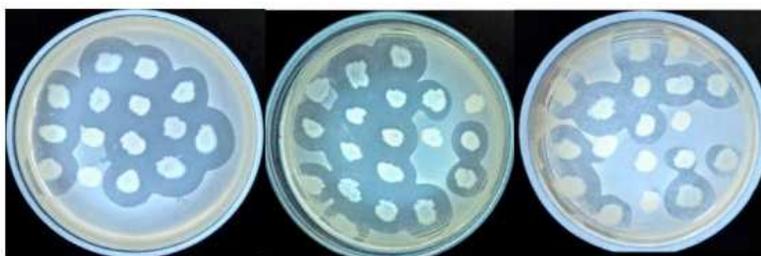


Figura 1. Atividade antagonista de amostras transconjugantes. Halos de inibição produzidos pelas amostras transconjugantes de *E. coli* ATCC 25922 recuperadas de meio com ampicilina, contra a amostra reveladora SS12.

Eletroforese

O perfil plasmidial das amostras é apresentado na FIG. 2. A amostra *S. sonnei* SS9 apresentou quatro bandas com massas moleculares distintas, quais sejam: superior a 10.000 pb e aproximadamente 5.000 pb, 4.000 pb e 3.000pb. A amostra receptora apresentou perfil díspar da amostra produtora, com exceção de uma banda com massa molecular superior a 10.000 pb, é também observado duas bandas superiores a 10.000 pb e outras duas com cerca de 2.500 pb e 1.500 pb, respectivamente. As bandas 2 e 3 de SS9 foram observadas em todas as amostras transconjugantes, enquanto a banda 4 foi visualizada apenas em algumas amostras. O perfil eletroforético comprova a eficiência da transferência por conjugação dos plasmídios.

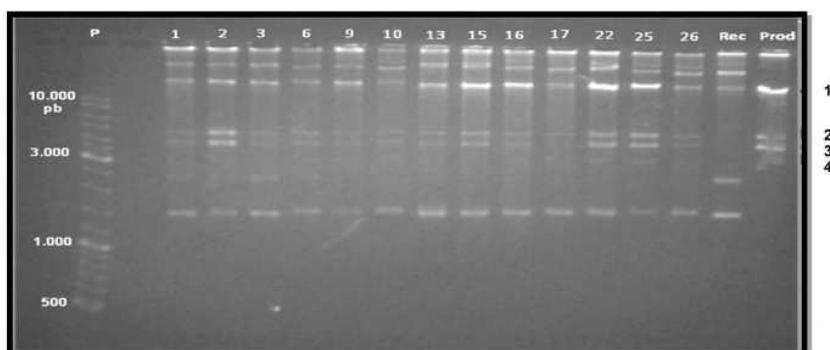
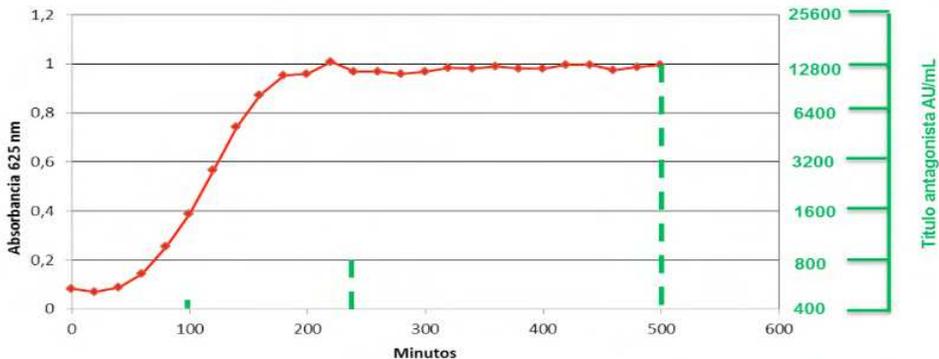


Figura 2. Perfil plasmidial das amostras produtora, reveladora e transconjugantes.

P, padrão de massa molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3); 1 a 26, transconjugantes; Rec, amostra receptora, *E. coli* ATCC 25922; Prod produtora, *S. sonnei* SS9.

Curva de crescimento e teste de atividade antagonista do transconjugante

A amostra transconjugante 9, avaliada em relação a curva de crescimento bacteriano e a produção de substâncias antagonistas, apresentou início das fases exponencial e estacionária aos 60 e 180 min, respectivamente. A presença no meio extracelular da(s) substância(s) antagonista(s) iniciou, durante a fase exponencial, a 1h 40 min, com título 400 UA/mL com presença de halos de inibição pouco nítidos. Às 4 h o título antagonista foi de 800 UA/mL com halos ainda pouco nítidos. O melhor resultado da ação inibitória foi observado durante a fase estacionária, a partir das 8h 20 min, com 400 UA/mL em halos límpidos e 12.800 UA/mL com halos menos nítidos (FIG. 3 e 4).



Curva de crescimento e título antagonista da amostra transconjugante 9, *E. coli* ATCC 25922 conjugada com plasmídeo(s) de *S. sonnei* SS9 produtora de substâncias antagonistas.

Figura 3. Curva de crescimento bacteriano e produção de substância(s) antagonista(s).

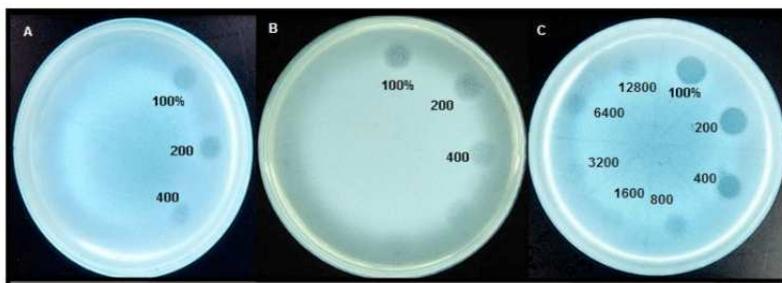


Figura 4. Produção de substância(s) antagonista(s) sintetizada pelo transconjugante 9 durante a curva de crescimento bacteriano.

Atividade e título antagonista do transconjugante 9, contra a amostra reveladora SS12. **A**, Início da atividade antagonista e título de 400 UA/mL da amostra recuperada na fase lag, com 1h 40min de cultivo; **B**, atividade e título antagonista de 800 UA/mL da amostra obtida após 4h de cultivo; **C**, Atividade e título antagonista de 12.800 UA/mL da amostra recuperada às 8h e 20min de cultivo.

4 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Relatos recentes demonstram preocupação mundial do surgimento de isolados de *Shigella* spp. (MDR) e (XDR), incluindo *S. sonnei* [29]. A amostra *S. sonnei* SS9 é resistente aos antimicrobianos trimetoprima e ampicilina, sendo o primeiro a droga de escolha pelo Ministério da Saúde Brasileiro no combate a shigelose. Os genes de resistência podem ser transferidos, por conjugação, para outras bactérias, inclusive de gênero distinto da amostra de origem. Após o ensaio de conjugação a amostra transconjugante selecionada demonstrou a característica fenotípica de resistência aos mesmos fármacos. Essa transferência plasmidial também pode ser observada pelo perfil eletroforético das amostras *S. sonnei* doadora, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* transconjugante. A transferência de plasmídeo que codifica resistência a ampicilina foi observada há partir 15 minutos. Watanabe & Fukasawa (1960) também relataram a transferência de resistência a antimicrobiano no mesmo período de

tempo. Resultados semelhantes também foram reportados por Yah (2010), que observou a transferência de plasmídeo conjugativo que codificava resistência antimicrobiana, inclusive à ampicilina, entre amostras de *Shigella* e *E. coli*.

Como visto, é crescente o perfil de resistência à antibióticos, o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de outros compostos que possam atuar contra esses microrganismos. Além da síntese de moléculas que conferem resistência, SS9 também produz substância(s) com capacidade antagonista contra outro isolado da mesma espécie, SS12. Após o ensaio de conjugação entre *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC25922 foi demonstrado que os genes que codificam a(s) substância(s) estão contidos em plasmídeo(s) conjugativo(s). A curva de crescimento e produção de substância antagonista demonstrou que a amostra *E. coli* transconjugante 9 iniciou a síntese dessa molécula durante a fase exponencial e o melhor título antagonista contra o isolado clínico SS12 foi observado durante a fase estacionária. A substância antagonista confere a amostra que a produz um fator de virulência por atuar contra outras bactérias e assim contribuir na instalação e permanência em um novo habitat [18]. Com base na sua capacidade antagonista contra o agente etiológico da shigelose, essa molécula pode, no futuro, despertar interesse como um modelo para a produção de fármaco.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), proc. n° CBB-APQ-02068-15, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG), Brasil.

REFERÊNCIAS

1. BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A.; KOTLOFF, K. F.; LEVINE, M. M. **Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research.** *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v.10, p. 245–255, 2013.
2. BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. **Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag.** *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.
3. BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS T. D. Bacteriocin production by strains of ***Bacteroides*** isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.11, p.718-724, 1977.
4. Clinical And Laboratory Standards Institute. **M100-S15: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio: norma aprovada.** v. 23, 2003, p.177.

5. Clinical And Laboratory Standards Institute. **M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** v. 38, ed. 28, 2018. p.296.
6. DUGGAN, G. M.; MOSTOWY, S. Use of zebrafish to study **Shigella** infection. *Dis Model Mech.*, v.11, p.1-11, 2018.
7. DUPONT, H. L.; LEVINE, M. M.; HORNICK, R. B.; FORMAL, S. B. **Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission.** *J Infect Dis.*, v. 159, p. 1126-1128, 1989.
8. FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R. **Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of Bacteroides fragilis isolated from Callithrix penicillata.** *Res. Microbiol.*, v.145, p.9-16, 1994.
9. GAUFIN, T.; BLUMENTHAL, J.; RAMIREZ-SANCHEZ, C.; MEHTA, S.; PRIDE, D. T.; FIERER, J.; JENKS, J. D. **Antimicrobial-Resistant Shigella spp. in San Diego, California, USA, 2017–2020.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 28, p.1110-1116, 2022.
10. HALIMEH, F. B.; RAFEI, R.; OSMAN, M.; KASSEM, II.; DIENE, S.M.; DABBOUSSI, F.; ROLAIN, J.M.; HAMZE, M. **Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of Shigella.** *Braz J Microbiol.* v. 52, p.2043-2055, 2021.
11. JENNISON, A. V.; VERMA, N.K. **Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development.** *FEMS Microbiol.Rev.*,v. 28, p. 43-58, 2004.
12. KHAN, S.; SINGH, P.; ANSARI, M.; ASTHANA, A. **Isolation of Shigella species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal.** *Asian Pac J Trop Dis.*, v.4, p.30-34, 2014.
13. KOTLOFF, K. L., RIDDLE, M. S., PLATTS-MILLS, J. A., PAVLINAC, P., & ZAIDI, A. K. M. **Shigellosis.** *Lancet.* v.391, p.801-812, 2018.
14. LEDERBERG, J.; E. M. LEDERBERG. **Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.** *J. Bacteriol.* v.63, p. 399-406, 1952.
15. MAHMOUD, R. Y.; LI, W.; ELDOMANY, R. A.; EMARA, M.; YU, J. **The Shigella proU system is required for osmotic tolerance and virulence.** *Virulence.* v.24, p.1-13, 2016.
16. MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. **Shigella: A model of virulence regulation in vivo.** *Gut Microbes*, v. 3, p. 104-120, 2012.
17. MCCRICKARD, L. S.; CRIM, S. M.; KIM, S.; BOWEN, A. Disparities in severe shigellosis among adults - Foodborne diseases active surveillance network, 2002-2014. *BMC Public Health.* v. 18, p.1-8, 2018.
18. MOREIRA, J. S. **Caracterização da primeira microcina e de outras bacteriocinas sintetizadas por Shigella sonnei.** 242f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

19. MOREIRA, J. S. **Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios colicínogênicos de *Shigella sonnei*** 189f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2018.
20. NIYOGI, S. K. **Shigellosis**. *J. Microbiol.*, v. 43, p. 133-143, 2005.
21. NUNES, R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M. M.; MENDES E. N. **Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials**. *J Pediatr.*, v.88, p.125-128, 2012.
22. PHALIPON, A.; SANSONETTI, P.J. ***Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?** *Immunol Cell Biol.*, v. 85, p.119–129, 2007.
23. RILEY, A. M.; WERTZ, J. E. **Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application**. *Rev. Microbiol.*, v.56, p.117–137, 2002.
24. SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. **Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea**. APMIS: *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 118, p. 125-135, 2010.
25. SOUSA, M. A. B.; FARIAS, L. M.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, J. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. **Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei* identification of a putative new bacteriocin**. *Men Inst Oswaldo Cruz*, v.108, p.724-729, 2013.
26. SREENIVASAN, S.; KALI, A.; PRADEEP, J. Multidrug resistant ***Shigella flexneri*** infection simulating intestinal intussusception. *J Lab Physicians*. v. 8, p. 55–57, 2016.
27. WATANABE, T.; FUKASAWA, T. **Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I transfer of resistance factors by conjugation**. *J Bacteriol.*, v.81, p.668-678, 1960.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality**. Department of vaccines and biologicals. Geneva, Switzerland, 1999.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Extensively drug-resistant ***Shigella sonnei*** infections - Europe - European Region (EURO). *Disease Outbreak News*, 2022.
30. YAH, C. S. **Plasmid-Encoded Multidrug Resistance: A Case study of *Salmonella* and *Shigella* from enteric diarrhea sources among humans**. *Biol Res.*; v. 43: p.141-148, 2010.