

Plesiomonas shigelloides: um enteropatógeno emergente?

Falcão, J.P.^{1*}; Gibotti, A.A.²; Souza, R.A.¹; Campioni, F.¹; Falcão, D.P.³

¹Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

²Escola de Saúde e Bem Estar/Medicina, Universidade Anhembi Morumbi, Laureate International Universities, São Paulo, SP, Brasil.

³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 26/09/07 / Aceito 26/10/07

RESUMO

Plesiomonas shigelloides é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, isolado de água doce e salgada, de peixes de água doce, mariscos e de inúmeros tipos de animais. Suspeita-se que a maioria das infecções humanas causadas por *P. shigelloides*, seja veiculada pela água, pois a bactéria está presente em águas não tratadas que são usadas para beber, águas recreacionais ou água para lavar alimentos que são consumidos sem cozimento ou aquecimento. A ingestão de *P. shigelloides* não causa sempre doença no animal hospedeiro, mas o microrganismo pode permanecer temporariamente como membro transitório não infeccioso da microbiota intestinal. A bactéria é isolada de fezes de pacientes com diarreia, mas algumas vezes também de fezes de indivíduos sem sintomas. A doença causada por *P. shigelloides* é a gastroenterite, que normalmente é auto-limitante, com febre, calafrio, dor abdominal, náusea, diarreia ou vômito. Em casos graves, as fezes diarreicas podem ser verde-amareladas, espumosas e com presença de sangue. A bactéria pode também causar infecções extra-intestinais. Ademais, pode produzir toxinas e ser invasora. As características utilizadas para considerar *P. shigelloides* como um enteropatógeno não são totalmente convincentes. Embora seja isolada de pacientes com diarreia e incriminada em vários surtos epidêmicos envolvendo água e alimentos contaminados, não foi possível identificar em muitas amostras de *P. shigelloides*, associadas com infecções gastrintestinais, um mecanismo de virulência definitivo.

Palavras-chave: *P. shigelloides*; enteropatógeno; gastroenterite; diarreia; infecções extra-intestinais.

INTRODUÇÃO

O nome *Plesiomonas* foi dado por Habs e Schubert

e deriva do grego "*plesios*" que significa vizinho e "*monad*" que significa unidade, pela sua proximidade com *Aeromonas* (Habs & Schubert, 1962).

O gênero *Plesiomonas* é composto por apenas uma espécie, *P. shigelloides*, que foi originalmente descrita por Ferguson & Henderson (1947), como uma *Enterobacteriaceae* móvel, denominada inicialmente C27, que possuía o antígeno principal de *Shigella sonnei* fase 1. No entanto, a bactéria apresentava grande número de propriedades distintas daquelas de *S. sonnei*, incluindo motilidade, produção de indol, fermentação tardia de lactose e inabilidade em produzir ácido a partir de D-manitol, sendo alocada no grupo anaerogênico *Paracolon* devido a tais características. Pelo fato de apresentar flagelação polar, foi incluída no gênero *Pseudomonas*, espécie *shigelloides*, pelas suas características semelhantes à *Shigella*. Posteriormente, foi transferida ao gênero *Aeromonas* como *A. shigelloides*, em decorrência de suas características de metabolismo fermentativo e similaridade em morfologia, flagelos e características bioquímicas com *Aeromonas*. A seguir, essa denominação foi alterada pela proposta da criação do gênero *Plesiomonas* com a espécie *shigelloides*. Pelo menos duas outras propostas foram feitas subsequentemente, alocando *P. shigelloides* nos gêneros *Fergusonia* e *Vibrio*. Até recentemente, o gênero *Plesiomonas*, espécie *shigelloides*, pertenceu à família *Vibrionaceae*, juntamente com os gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* (Janda, 2005).

Estudos moleculares, particularmente a análise das seqüências de nucleotídeos de RNA ribossomal 5S e 16S, mostraram que *P. shigelloides* está mais próxima de bactérias do gênero *Proteus*, que dos membros da família *Vibrionaceae*, o que sugere uma relação filogenética de *Plesiomonas* com a família *Enterobacteriaceae* (Martinez-Murcia et al., 1992; Ruimy et al., 1994). Adicionalmente, Huys & Sings (1999) genotiparam linhagens de *Aeromonas* spp. por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e verificaram que *P. shigelloides* posicionou-se fora do principal *cluster* formado por *Aeromonas*. Devido a esses achados, o gênero *Plesiomonas* foi alocado na família

*Autor correspondente: Juliana Pfrimer Falcão - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, USP - Av. do Café, s/nº - CEP: 14040-903 - Ribeirão Preto - SP, Brasil. Telefone: (16) 3602-4896 - Fax: (16) 3602-4725 - e-mail: jufalcao@fcrfp.usp.br

Enterobacteriaceae como mencionado na última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Janda, 2005). A maioria dos gêneros e espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* é caracterizada como não produtora da enzima oxidase (Farmer III, 2007) e sendo *P. shigelloides* oxidase positiva, há a necessidade de redefinição das características dessa família. Porém, essa discussão ainda continua em aberto, pois foi sugerida a criação de uma nova família, *Plesiomonadaceae*, com uma espécie, *P. shigelloides* (Ruimy et al., 1994).

O principal habitat de *P. shigelloides* é o ambiente aquático, incluindo a água doce e do mar. Em países tropicais e subtropicais do sul da Ásia como Japão e Tailândia, vários países da África, Taiti e Austrália é comumente encontrada no intestino de peixes (Islam et al., 1991; Schubert & Beichert, 1993; Aldova et al., 1999; Pasquale & Krovacek, 2001; Janda, 2005). Sua ocorrência não é freqüente nos Estados Unidos e Europa, embora estudos recentes descrevam seu isolamento em países escandinavos evidenciando que não são apenas microrganismos de temperaturas tropicais ou subtropicais (Krovacek et al., 2000). Nas últimas décadas, começou a ser isolada e estudada no Brasil, bem como em outros países tropicais do continente americano como Cuba, Venezuela, Costa Rica e Peru (Leitão & Silveira, 1991; Monteiro-Neto & Santos, 1993; Mondino et al., 1995; Gibotti et al., 2000; Kirov, 2001; Janda, 2005).

P. shigelloides pode colonizar uma grande variedade de animais aquáticos como peixes, mariscos e camarões, mas também mamíferos como gatos, cães, suínos, entre outros. Os animais, alimentos e águas contaminadas são considerados como os veículos de transmissão de *Plesiomonas* para o homem (Kirov, 2001; Janda, 2005).

A bactéria causa doença intestinal, sobretudo em indivíduos que vivem ou viajam para países tropicais e que ingerem alimentos marinhos crus e consomem água e/ou alimentos contaminados (Abbott, 2003).

CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

P. shigelloides é um bacilo Gram-negativo, que mede 0,3 a 1,0 µm de diâmetro por 2,0 a 3,0 µm de comprimento, anaeróbico facultativo que apresenta motilidade por meio de dois a sete flagelos polares, produz a enzima oxidase, fermenta o inositol, a glicose e outros poucos carboidratos sem produção de gás, descarboxila a lisina e ornitina, dihidrolisa a arginina e é sensível ao agente Vibriostático O/129. Sua temperatura de crescimento varia entre 8 e 44°C, sendo considerada ótima em torno de 37 a 38°C. *P. shigelloides* apresenta pH ótimo de crescimento na faixa de 4,0 a 8,0 e é capaz de crescer em concentrações de sais que variam de 0 a 5% sendo bem tolerante às concentrações de 3,0 a 3,5% de NaCl (Kirov, 2001; Abbott, 2003; Janda, 2005).

Há outras características bioquímicas que não são usadas na identificação de *P. shigelloides*, mas que são importantes para propósitos industriais e para estratégias de sobrevivência como a habilidade de produzir trealose

(Yoshida et al., 1998), a enzima de restrição *PshAI* (Miyahara et al., 1990) e quitinase (Ramaiah et al., 2000). A quitina é um complexo polímero de carboidrato, abundante em ambientes aquáticos e que forma a cutícula de crustáceos e de muitos moluscos. Como muitas outras bactérias aquáticas, *P. shigelloides* pode utilizar, por meio da produção de quitinases, este composto polimérico como fonte de carbono e como um caminho para penetrar no exoesqueleto de diferentes organismos e ali se estabelecer (Ramaiah et al., 2000). Miyahara et al. (1990) descreveram uma nova endonuclease de restrição produzida por *P. shigelloides*. Essa enzima foi denominada *PshAI* e pode ser muito útil em metodologias de DNA recombinante devido a sua estabilidade e reconhecimento de um novo sítio de restrição (GACNN/NNGTC).

A macromorfologia de *P. shigelloides* revela diferentes aparências de colônias, dependendo do ágar utilizado e se esse é seletivo ou diferencial. Vários meios seletivos foram indicados no isolamento do microrganismo quer de amostras ambientais quer de espécimes clínicos contaminados, como fezes, sangue e outros. O melhor meio seletivo diferencial encontrado para recuperar *P. shigelloides* de ambos os tipos de espécimes é o ágar inositol-verde brilhante-sais biliares (IBB). Como meio de enriquecimento, a água peptonada alcalina pH 8,6 é considerado o melhor (Janda, 2005). Utilizando este esquema, enriquecimento em água peptonada alcalina seguido de isolamento em ágar IBB, nosso grupo isolou *P. shigelloides* de sete amostras de água doce em Londrina, PR (Gibotti et al., 2000). No entanto, empregando esse mesmo esquema, não conseguimos isolar o microrganismo em diferentes tipos de água doce em Araraquara, SP (Falcão et al., 1998).

P. shigelloides apresenta antígenos somáticos "O" e flagelares "H". Aldova & Shimada (2000) propuseram um esquema internacional que reconhece em *P. shigelloides*, 102 antígenos somáticos (O) e 51 flagelares (H). Inicialmente, Aldova & Geizer (1968) identificaram 13 antígenos O e 15 antígenos H. Posteriormente, Shimada & Sakazaki (1978), caracterizaram outros antígenos e propuseram um esquema que consistia de 40 sorotipos. A partir daí, novos sorotipos foram descritos até finalmente ter sido criado o esquema internacional unificado (Aldova & Shimada, 2000).

Os esquemas acima mencionados foram baseados em antígenos de amostras clínicas de humanos e outros animais homeotérmicos. Entretanto, como *P. shigelloides* tem como principal habitat a água e/ou animais aquáticos, um outro esquema foi desenvolvido com antígenos de amostras de referência isoladas de água e animais aquáticos. Esse esquema consiste de 23 antígenos somáticos (O) e 5 antígenos flagelares (H) (Aldova & Schubert, 1996). Este segundo esquema é útil na tipagem de amostras ambientais.

É importante ressaltar que *P. shigelloides* pode aglutinar com soros utilizados para sorotipar *Shigella* o que pode, algumas vezes, acarretar no diagnóstico errado de *P. shigelloides* como sendo *Shigella* (Abbott, 2003). Assim, algumas sorovariedades apresentam identidade total ou parcial com antígenos somáticos de *Shigella*. A sorovariedade

17, que é encontrada em amostras isoladas de material clínico possui reação cruzada com anti-soro de *Shigella* grupo D e é idêntica ao antígeno O de *S. sonnei* (Abbott et al., 1991). Um outro tipo de relação existe entre a sorovariedade O:11 e *S. dysenteriae* 8, sorovariedade O:22 e *S. dysenteriae* 7, sorovariedade O:23 e *S. boydii* 13, sorovariedade O:54 e *S. boydii* 2 e sorovariedade O:57 e *S. boydii* 9 (Shimada et al., 1994). Certas *Plesiomonas* também compartilham antígeno tipo-específico com *S. flexneri* 6 e um antígeno grupo 1 com *S. dysenteriae* 1 (Albert et al., 1993).

As linhagens de *P. shigelloides* isoladas de amostras de água doce, por nosso grupo (Gibotti et al., 2000), foram classificadas por Shimada, no Japão, como sendo dos sorotipos O4:H3; O34:H1; O35:H2; O41:H1; O44:H1 e O52:H2.

SIGNIFICADO CLÍNICO

O trato gastrointestinal é o local primário do qual *P. shigelloides* tem sido recuperada. Embora não existam provas definitivas mostrando que seja um enteropatógeno, várias evidências dão suporte ao seu papel na gastroenterite. Essas evidências incluem a baixa taxa de portadores assintomáticos, investigações de caso-controle, relatos de casos bem circunstanciados e surtos de doenças diarreicas (Brenden et al., 1988). A taxa de portadores assintomáticos é bem baixa, variando de 0 a 5,5%, sendo na maioria dos casos de 0,1% (Arai et al., 1980; Holmberg & Farmer III, 1984; Bozsó et al., 1986). Estudos caso-controle descreveram taxas de isolamento de *P. shigelloides* de três a vinte vezes maiores entre pacientes sintomáticos que entre assintomáticos (Pitarangsi et al., 1982; Bozsó et al., 1986; Lim et al., 1987). Foram relatadas taxas elevadas (22,0%) de isolamento do microrganismo em crianças com diarreia sanguinolenta (Taylor & Echeverria, 1986). Casos esporádicos de gastroenterite mostraram elevado número (3×10^8 UFC/mL) de *P. shigelloides* em biópsias duodenais (Penn et al., 1982) e anticorpos contra o lipopolissacarídeo da linhagem infectante (van Loon et al., 1989). *P. shigelloides* foi implicada em pelo menos dois grandes surtos de doenças diarreicas transmitidas através da água no Japão, envolvendo ao redor de 1.000 pessoas (Tsukamoto et al., 1978). Em um dos surtos o sorotipo responsável foi o O17:H2 e no outro, o sorotipo O24:H5. Esses sorotipos foram isolados dos pacientes e de água de torneira de diferentes localidades onde ocorreram os surtos. Um terceiro surto, não tão bem documentado estava ligado ao consumo de ostras contaminadas (Rutala et al., 1982).

PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA

Pouco é conhecido a respeito da colonização intestinal humana por *P. shigelloides* bem como sobre a sua interação com a camada mucóide que recobre o epitélio intestinal. Um estudo de Vitovec et al. (2001) sobre infecção experimental em camundongos BALB recém-nascidos, inoculados por via oral com a bactéria, mostrou uma

colonização intestinal de longa duração associada a lesões intestinais. Essas lesões variam de atrofia a necrose da mucosa interna do íleo e cólon e das bordas escovadas dos enterócitos do cólon. Os autores sugerem que este animal pode ser um bom modelo para o estudo da infecção *in vivo* de *P. shigelloides*.

Alguns estudos mostraram que *P. shigelloides* aderiu e invadiu células HeLa e células HEP-2, justificando as formas disentericas da doença (Schubert & Holz-Bremer, 1999). Foi verificado que filtrados de cultura de *P. shigelloides* apresentavam citotoxicidade para células Y-1 e CHO (Sanyal et al., 1980; Pitarangsi et al., 1982;). No entanto, vários estudos apresentam o teste de Séreny como uniformemente negativo (Pitarangsi et al., 1982; Olsvik et al., 1990; Albert et al., 1993).

A invasão de células HeLa por *P. shigelloides* isoladas de fezes de criança com diarreia aguda foi comparável à de *S. sonnei* (Saraswathi et al., 1983; Brenden et al., 1988; Olsvik et al., 1990; Farmer III et al., 1992). Holmberg et al. (1986), num estudo clássico sobre *Plesiomonas*, mostraram que pacientes dos quais se isolou *P. shigelloides* apresentavam sintomas típicos de infecções produzidas por um microrganismo entérico invasor e que 23 dos 27 isolados destes pacientes continham plasmídios. Em 12 isolados foi encontrado apenas um plasmídio de alto peso molecular (>150 MDa, ~230Kb). Esse plasmídio é diferente daqueles de alto peso molecular detectados em *Shigella* spp. e em *E. coli* enteroinvasora. Plasmídios de alto peso molecular também foram encontrados em amostras de pacientes com colite associada a *P. shigelloides*. É bastante provável que um plasmídeo de virulência esteja envolvido na patogenicidade de *P. shigelloides* (Kirov, 2001).

Até o momento não foi possível estabelecer uma real e comprovada associação positiva entre infecções supostamente causadas por *P. shigelloides* com marcadores de virulência, embora vários deles, a seguir relacionados, tenham sido pesquisados e estudados.

Adesão

A adesão celular é um passo fundamental para a infecção bacteriana e muitos enteropatógenos possuem em sua superfície estruturas como fímbrias, flagelos ou glicocálice que facilitam a aderência à superfície da célula hospedeira (Theodoropoulos et al., 2001). Esses autores mostraram pela primeira vez a aderência e invasão de células epiteliais de intestino *in vitro* por *P. shigelloides* nas quais foram observados flagelos. Também encontraram, pela primeira vez, estruturas semelhantes às fímbrias em *P. shigelloides*. Isso sugere que essas estruturas tenham função na aderência da bactéria às células epiteliais e que um estímulo das células hospedeiras seja necessário para sua expressão, pois essas estruturas somente foram observadas quando a bactéria estava em forte associação com a célula hospedeira e nunca na ausência das células. A aderência de *P. shigelloides* foi observada na superfície apical e basal das células, ocorrendo diretamente na membrana plasmática e/

ou microvilosidades. Aparentemente, não ocorre destruição da estrutura dessas microvilosidades e nem evidência de lesões como as formadas durante a aderência de *E. coli* enteropatogênica.

Com o uso de microscopia eletrônica de transmissão, foi detectado um glicocálice na superfície externa de *P. shigelloides*. Especula-se que este material esteja envolvido na adesão da bactéria às células epiteliais, constituindo-se, portanto numa adesina (Kirov, 2001).

Invasão

A habilidade de *P. shigelloides* de invadir células é relatada, mas com resultados contraditórios. Alguns estudos mostraram invasibilidade (Binns et al., 1984; Olsvik et al., 1990), entretanto, alguns outros não encontraram nenhum potencial invasivo para esse microrganismo (Sanyal et al., 1980; Herrington et al., 1987). Theodoropoulos et al. (2001) demonstraram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão e usando células de epitélio humano (Caco-2), que esta bactéria é capaz de invadir estas células.

Em um estudo realizado por Kayano et al. (2007), células epiteliais como HeLa, HEp-2, Vero, Caco-2 e HT-29 foram expostas a linhagens de *P. shigelloides* isoladas de água e 15 minutos após essa exposição as células estavam agregadas. Entretanto, não foi observada invasão.

Enterotoxinas

Os resultados encontrados são contraditórios no que diz respeito à enterotoxinas serem ou não potenciais fatores de virulência de *P. shigelloides*. Vários pesquisadores concluíram que o microrganismo não produz essas toxinas devido a resultados negativos obtidos em ensaios com alça ligada de coelho, ensaio com camundongo recém-nascido, cultura de células diversas e permeabilidade da toxina em pele de coelho (Miller & Kohburger, 1985; Brenden et al., 1988; Farmer III et al., 1992). No entanto, a produção de toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) foi descrita por Saraswathi et al. (1983). Também foi demonstrada a produção de enterotoxina *in vivo* usando principalmente dois modelos, coelhos e ratos recém-nascidos (Sanyal et al., 1975; 1980). Entretanto, Herrington et al. (1987) não encontraram nenhuma produção de enterotoxinas quando testaram seus isolados em coelhos. Manorama et al. (1983) caracterizaram e purificaram parcialmente as enterotoxinas ST e LT. Provavelmente, a chave para a detecção de enterotoxina em *Plesiomonas* seja a passagem seriada da bactéria *in vivo* (Brenden et al., 1988). No entanto, estudos utilizando sondas genéticas de DNA para toxina colérica (CT), LT, STa e STb não detectaram seqüências homólogas em *P. shigelloides*. Portanto, as enterotoxinas presentes em *P. shigelloides* têm mecanismos de ação desconhecidos (Olsvik et al., 1990).

Em trabalho realizado pelo nosso grupo (Gibotti et al., 2000), foi observado que nenhuma das linhagens de *P. shigelloides* isoladas de amostras de água de rio produziram enterotoxina ST pelo teste de Dean, utilizando meio de Evans ou BHI.

Citotoxinas

Citotoxina produtora de alongação

A bactéria também produz uma toxina termolábil que causa alongação de células de ovário de Hamster Chinês (CHO), similar àquela produzida pela toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae*, quando a bactéria é cultivada em meio de cultura pobre em ferro. Quando o meio é suplementado com ferro, a habilidade de *P. shigelloides* em produzir o fenômeno é perdida. Seu efeito na célula CHO é neutralizado quando é incubada com soro anti-CT e é destruída por aquecimento a 100°C por 20 minutos (Gardner et al., 1987). Esses autores também verificaram que a alongação das células CHO foi observada quando *P. shigelloides* foi cultivada em um meio com pouca quantidade de ferro (menos que 0,5 µg de Fe³⁺/mL). Observaram, também, que quantidades maiores que 0,1 µg de Fe³⁺/mL diminuíam consideravelmente a reatividade com células CHO. A concentração de ferro no meio de crescimento é um importante fator na produção de várias toxinas bacterianas como a toxina da difteria, a exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, a toxina de *Shigella* spp. e a enterotoxina de *Salmonella* spp., porém nenhuma delas causa alongação em células CHO.

Citotoxina vacuolizante

Outra toxina produzida por *P. shigelloides* causa vacuolização em várias linhagens de células como HeLa, Vero, CHO e HT29 (Falcón et al., 2003). Os autores descreveram que a primeira alteração consiste na formação de um pequeno vacúolo citoplasmático, aproximadamente 30 minutos após a exposição das células a filtrados de cultura de *P. shigelloides*, tendo como subseqüentes alterações morfológicas, uma intensa vacuolização citoplasmática, seguida de arredondamento e inchaço das células que eventualmente, leva à desorganização e gradual destruição da camada celular. Após 24 horas, as células tratadas com o filtrado da cultura estavam mortas.

O aquecimento do sobrenadante da cultura a 56°C por 30 minutos leva a perda das atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*, indicando que a citotoxina é termolábil (Falcón et al., 2003). Este resultado difere da enterotoxina termolábil de *E. coli*, mas lembra a citotoxina termolábil de *Aeromonas hydrophila*, que induz efeitos hemolíticos em células de mamíferos (Falcón et al., 2001).

A neutralização por antisoro anti-enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila*, confirma que a toxina de *P. shigelloides* é antigenicamente próxima a esta (González-Rey, 2003).

Malachias et al. (2007) descreveram uma citotoxina purificada de sobrenadante de culturas de *P. shigelloides* que inoculada sobre células Vero, CHO, Caco-2 e HT-29 levou ao aparecimento de um extenso vacúolo intracelular, seguido de um encolhimento do núcleo e conseqüentemente morte de muitas células após 30 minutos.

Citotoxina ACRP-LPS

Okawa et al. (2004), para esclarecer a enteropatogenicidade de *P. shigelloides*, realizaram a purificação de uma citotoxina produzida por uma amostra desta bactéria. Os resultados evidenciaram que a citotoxina é composta por um complexo de três grandes proteínas e LPS (lipopolissacarídeos) e é dividida em duas metades. A toxina foi termoestável frente às temperaturas de 60 a 100°C por 10 a 30 minutos. Os autores sugeriram que a citotoxina do filtrado de uma cultura de *P. shigelloides* (complexo ACRP-LPS) tem citotoxicidade e enteropatogenicidade por ACRP (anti-CT-reactive proteins), sendo possivelmente um dos importantes fatores de virulência de *P. shigelloides*.

Cardiotoxina

Recentemente, em um estudo realizado por Filizzola et al. (2007), foi purificada uma citotoxina do sobrenadante de culturas de *P. shigelloides* isoladas de água. Após a administração intravenosa em camundongos, esta citotoxina causou depressão na condução elétrica intra-atrial e intra-ventricular. Isso sugere que *P. shigelloides* possa produzir uma possível "cardiotoxina" que pode ser um fator de virulência produzido por essa bactéria.

Hemolisina

A maioria das linhagens de *P. shigelloides* também apresenta uma β -hemolisina associada à célula que é produzida às temperaturas de 25 e 35°C. Essa hemolisina provavelmente, desempenha papel importante na captura de ferro *in vivo*. Seu papel na doença gastrointestinal é ainda desconhecido.

Janda & Abbott (1993) mostraram que a maioria das amostras desta bactéria secreta uma β -hemolisina em placas de ágar sangue de diferentes animais como porcos, coelhos, carneiros e bois. Descreveram uma melhor atividade em eritrócitos de carneiro, coelho e porco, já nos eritrócitos de bovino a reação é tardia. A hemolisina produzida tem as características de uma proteína e é inativada por proteases em altas temperaturas. A gentamicina, um aminoglicosídeo, também inibe a atividade hemolítica, sugerindo que funções celulares são requeridas para a atividade enzimática.

Daskaleros et al. (1991) não observaram atividade hemolítica de *P. shigelloides* quando as amostras foram cultivadas na superfície de placas de ágar sangue, mas quando as bactérias foram crescidas em meios líquidos com sangue ou em placas de ágar sangue não muito consistentes produziram uma hemólise detectável, o que sugere que tensões de oxigênio ou viscosidade podem influenciar a expressão da hemolisina.

Baratéla et al. (2001) detectaram atividade hemolítica em todas as amostras crescidas em placas de ágar sangue usando o meio de cultura ágar Luria Bertani (LB). Em outros tipos de meios, como ágar tripticase de soja (TSB) e infuso de cérebro e coração (BHI), somente algumas

amostras apresentaram essa característica.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, com sete linhagens de *P. shigelloides*, isoladas de água doce, verificou-se que todas as linhagens apresentaram produção parcial de hemolisina utilizando a técnica em placa de ágar sangue de carneiro (AS) e β -hemólise pela técnica em placa de ágar *overlay* (AO), utilizando-se eritrócitos do grupo O, de bovino, carneiro, coelho e cobaia, enquanto que pela técnica em microplaca (Mi), utilizando-se sangue de carneiro, apenas 57% (4/7) das amostras foram positivas (Gibotti et al., 2000).

Elastina

P. shigelloides produz enzimas extracelulares, como a elastase, a qual pode estar envolvida na degradação de tecido conectivo. Enzimas elastolíticas têm a habilidade de degradar tecidos conectivos e isso pode contribuir para a patogenicidade dos microrganismos (Rust et al., 1994). Santos et al. (1999) detectaram atividade elastolítica em suspensões celulares. Esta atividade aumentou quando a bactéria foi cultivada em TSB com ausência de ferro.

Tetradotoxina

A tetradotoxina (TTX) é uma neurotoxina marinha. Moluscos podem conter essa TTX sendo documentado um grande aumento no consumo de moluscos contendo TTX (Wei et al., 1994). Essa toxina pode ser produzida por várias espécies de bactérias, principalmente *Vibrio* spp. (Narita et al., 1987; Simidu et al., 1987; Hwang et al., 1989). Estudos da microbiota de moluscos revelaram a presença de *P. shigelloides* entre outros microrganismos (Hwang et al., 1989; Cheng et al., 1995). Estes mesmos autores testaram a produção de TTX nesses isolados bacterianos revelando *P. shigelloides* como um dos produtores de TTX.

Histamina

Scombroid poisoning é uma síndrome muito comum associada à ingestão de frutos do mar contendo altas concentrações de histamina. Alguns trabalhos sugeriram que *P. shigelloides* desempenha um importante papel como causador desta doença (Yoshinaga & Frank, 1982; Middlebrooks et al., 1988; Lopes-Sabater et al., 1996). Em uma recente investigação foi encontrado que 13,3% das amostras de *P. shigelloides* investigadas estavam aptas a produzir histamina (González-Rey, 2003).

Hemaglutininas

Não encontramos relatos na literatura sobre a capacidade hemaglutinante de *P. shigelloides*. Em dois trabalhos realizados por nosso grupo pesquisou-se este marcador de virulência. No primeiro, Gibotti et al. (2000) avaliaram sete linhagens isoladas de água doce e observaram que nenhuma delas hemaglutinou na presença de eritrócitos de cobaia (Co), de humano (H) e de cavalo (Cv). No outro

estudo, Campioni e colaboradores (dados não publicados), também estudaram *P. shigelloides* isoladas de água e observaram que a maioria das amostras apresentou atividade hemaglutinante frente a eritrócitos de galinha, sendo essa atividade inibida na presença dos carboidratos manose, dextrose, frutose e sacarose, não sendo influenciada pela presença de galactose, sorbose, lactose e maltose.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As infecções humanas causadas por *P. shigelloides* podem ser intestinais e extraintestinais.

Infecções intestinais

Gastreenterite causada por *P. shigelloides* foi descrita em diversos países. A doença diarreica varia de enterite moderada a disenteria (Holmberg et al., 1986). A forma semelhante à cólera é rara (Janda, 2005).

A diarreia pode ocorrer na forma secretória ou diarreia com sangue e muco (Kirov, 2001). A forma secretória, que é a mais comum, normalmente tem duração de um a sete dias, mas que pode ser prolongada (aproximadamente três semanas), apresenta várias evacuações ao dia (mais de 30) no pico da doença (Miller & Kohburger, 1985; Brenden et al., 1988). Holmberg et al. (1986) mostraram que a maioria dos pacientes adultos, dos quais *P. shigelloides* foi isolada, apresentavam sintomas de doença invasiva com sangue, fezes mucóides com leucócitos polimorfonucleares; relataram também que os pacientes apresentavam com frequência cólicas abdominais intensas, vômito e um pouco de desidratação. A mesma forma foi descrita por Ahmad et al. (1998).

van Loon et al. (1989) relataram a ocorrência em Bangladesh de uma outra forma de infecção intestinal por *P. shigelloides* com diarreia sanguinolenta persistente associada à colite pseudomembranosa. O tecido do cólon do paciente apresentava-se compatível com aquele de colite pseudomembranosa e a coprocultura mostrou o isolamento de *P. shigelloides* em cultura pura.

Os picos sazonais das infecções intestinais associadas a *P. shigelloides* são durante os meses quentes. Parece não haver correlação entre grupo etário e ocorrência de doença diarreica por *P. shigelloides* (Janda, 2005).

Um dado interessante observado por pesquisadores mexicanos é a não detecção de imunoglobulina IgA em soro de pacientes infectados com *P. shigelloides*, levantando dúvidas sobre o papel da bactéria na diarreia do viajante (Jiang et al., 1991).

A dose infectante do microrganismo capaz de causar diarreia em humanos não é conhecida. Nenhum dos 33 voluntários humanos tratados previamente com ampicilina para reduzir a microbiota intestinal normal e, posteriormente infectados com *P. shigelloides*, isolada de criança com diarreia que apresentava sangue, muco e leucócitos, desenvolveu a doença, mesmo quando a dose inoculante era maior que 10⁹ microrganismos. A mesma dose inoculada em

cobaias provocou diarreia em todos os animais (Kirov, 2001).

Infecções extraintestinais

P. shigelloides é relacionada como agente etiológico de várias infecções extraintestinais como septicemia, bacteremia, meningite, artrite, pseudoapendicite, colicistite, osteomielite e celulite (Henderson et al., 2001).

Entre estas síndromes, a mais frequente é a septicemia, sendo até o presente, relatados pelo menos 20 casos de septicemia por *P. shigelloides* (Janda, 2005). A maioria dos casos de bacteremia envolve pessoas em condições precárias de saúde, incluindo neonatos, indivíduos com discrasias hematológicas e doenças do fígado (Clark & Janda, 1991; Delforge et al., 1995; Riley et al., 1996).

A meningite acompanhada por septicemia é uma doença primária de recém-nascidos (Billiet et al., 1989). A maioria dos casos de meningite refere-se a crianças cujos partos foram complicados por várias condições clínicas, incluindo, ruptura da placenta (Clark & Janda, 1991). Foi relatado um caso interessante de septicemia associada com celulite na mão esquerda de um indivíduo que manuseava peixes ao norte da Noruega. Esses casos de septicemia associada à outras infecções são muito graves, levando normalmente à morte (Henderson et al., 2001).

Complicações extraintestinais não frequentes incluem doença biliar (Claesson et al., 1984; Körner et al., 1992), abscesso pancreático (Kennedy et al., 1990); pseudoapendicite (Fischer et al., 1988), artrite (Gordon et al., 1983), osteomielite (Ingram et al., 1987) e infecção ocular (Butt et al., 1997).

OCORRÊNCIA EM ANIMAIS

O frequente isolamento de *P. shigelloides* em diferentes espécies de animais reflete a probabilidade de exposição à bactéria na água. Dessa forma, é mais comum o isolamento em peixes, répteis, mamíferos e aves, respectivamente. É provável que essa bactéria pertença à microbiota intestinal normal de peixes e alguns outros animais que residem na água como anfíbios e alguns répteis, porém sua presença esporádica em fezes de animais pode ser devido à ingestão de peixes, água contaminada ou comida contaminada (Jagger, 2000).

Não existem muitos relatos sobre a associação de *P. shigelloides* com infecções e diarreias em animais, porém a bactéria é frequentemente isolada de diarreia em gatos. É encontrada com maior frequência nessa espécie do que em outros mamíferos. Também existem relatos de isolados de outros animais doentes como do pulmão de lontras com pneumonia, cachorros com enterite, fígado de patos, gado, pingüins e ursos com diarreia sangüínea violenta (Jagger, 2000).

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

P. shigelloides é uniformemente susceptível *in vitro* a fluoroquinolonas, carbapenems, monobactâmicos,

sulfametoxazol-trimetoprim e as cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações (Janda, 2005). A maioria dos isolados é resistente a penicilinas, incluindo ampicilina, piperacilina, ticarcilina, meziocilina e carbenicilina. Isto parece ser devido à produção de uma β -lactamase pela bactéria, já que isolados que a produziram não foram susceptíveis *in vitro* à penicilina e isolados que não a produziram foram susceptíveis (Jagger, 2000).

A resistência a aminoglicosídeos é variável. Jagger (2000) demonstrou que a resistência a gentamicina, tobramicina e amicacina foi comum. Entretanto, outro estudo identificou somente poucas amostras com resistência a tobramicina e gentamicina (Stock & Wiedemann, 2001).

No estudo realizado pelo nosso grupo, as sete linhagens de *P. shigelloides* isoladas foram testadas para avaliar a resistência a drogas como ampicilina, penicilina, amicacina, gentamicina, tobramicina, cefalotina, carbenicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, neomicina, cloranfenicol, norfloxacin, tetraciclina e nitrofurantoína. A maioria das sete *P. shigelloides* isoladas apresentou resistência à penicilina, ampicilina, amicacina, carbenicilina e neomicina. Algumas dessas amostras foram também resistentes a gentamicina. Todas elas foram sensíveis a cloranfenicol, norfloxacin, tetraciclina e nitrofurantoína (Gibotti et al., 2000).

OCORRÊNCIA NO BRASIL

No Brasil, existem poucos relatos sobre a ocorrência de *P. shigelloides*.

Leitão & Silveira (1991) isolaram *P. shigelloides* de cinco amostras de peixe de origem fluvial no estado de São Paulo.

Mondino et al. (1995) isolaram 46 linhagens de *P. shigelloides* de amostras de água doce poluída e não poluída e água de mar, na cidade do Rio de Janeiro.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo foram analisadas amostras de água coletadas ao longo da bacia do Ribeirão Cambé, na região de Londrina e de Cambé-PR, no período entre abril de 1992 e março de 1993, tendo sido isoladas sete linhagens de *P. shigelloides* (Gibotti et al., 2000). Entretanto, em um estudo anterior, também realizado pelo nosso grupo, a presença de *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae* e *P. shigelloides* foi pesquisada em várias fontes de água doce da cidade de Araraquara-SP, tendo sido isoladas amostras de *Aeromonas* spp. e *Vibrio cholerae*, mas não de *P. shigelloides* (Falcão et al., 1998).

O primeiro relato sobre o isolamento de *P. shigelloides* de material clínico de humanos foi de duas crianças no Maranhão, com diarreia prolongada (três semanas) que apresentavam febre, dores abdominais e fezes com numerosos leucócitos (Monteiro Neto & Santos, 1993). Também foram isoladas duas linhagens de *P. shigelloides* de fezes diarreicas de adultos nos anos de 1998 e 2002 pelo Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, SP (M.I.C. Medeiros e colaboradores - dados não publicados).

CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL

O isolamento de *P. shigelloides* não é relatado na literatura especializada com tanta frequência como ocorre com outros patógenos entéricos. Embora o número de casos descritos nos últimos anos tenha aumentado, há evidência que muitos laboratórios não têm dado importância ao isolamento do microrganismo (Clinical Microbiology Proficiency Testing, 2000).

O isolamento e a identificação de *P. shigelloides* podem ser realizados quer utilizando os esquemas e meios convencionais empregados na identificação de enterobactérias, quer utilizando enriquecimento em água peptonada alcalina pH 8,6 seguido de isolamento em meio de cultura específico como o Ágar IBB e/ou outros meios para bactérias entéricas como Ágar SS e Ágar MacConkey. Embora estes últimos meios possam ser utilizados para o isolamento de *P. shigelloides*, não são eficazes na sua diferenciação porque contêm lactose e bactérias do gênero *Plesiomonas* podem ser tanto lactose negativas como positivas. Colônias claras nesses últimos meios podem ser confundidas com enterobactérias que não produzem lactose, principalmente *Shigella* (Gibotti, 1996), com a qual *P. shigelloides* apresenta reação antigênica somática cruzada (Janda, 2005). O teste da oxidase permite a diferenciação entre estes microrganismos, pois *P. shigelloides* é oxidase positiva, enquanto *Shigella* é oxidase negativa (Abbott, 2003). No meio de Ágar IBB, *P. shigelloides* fermenta o inositol, que é o carboidrato desse meio, produzindo colônias avermelhadas, enquanto bactérias não fermentadoras de inositol, como *E. coli*, apresentam-se como colônias claras (Gibotti, 1996). Portanto, a combinação de enriquecimento em água peptonada alcalina pH 8,6 e a utilização do ágar IBB, por apresentar os melhores resultados é a indicada para o isolamento de *P. shigelloides* (Janda, 2005).

Após o isolamento, os requisitos metabólicos mínimos para a confirmação dessa bactéria são reações positivas para descarboxilação da lisina e ornitina, dihidrolase da arginina, oxidase, indol, fermentação do inositol e glicose e produção de beta-hemólise em ágar-sangue. Entretanto, testes adicionais, como a sensibilidade ao agente Vibriostático O/129, entre outros, são sempre necessários para uma melhor identificação desse bacilo (Abbott, 2003).

Existe também uma variedade de kits comerciais como o TTE-AS e o API 20E que dão resultados confiáveis para a identificação de *P. shigelloides* (Krovacek et al., 2000).

A caracterização completa é realizada pela pesquisa dos antígenos somáticos e flagelares (Janda, 2005). No entanto, essa caracterização sorológica é realizada em poucos laboratórios de referência que não são encontrados no Brasil (Falcão et al., 1998; Gibotti et al., 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As evidências utilizadas para considerar *P. shigelloides* como um enteropatógeno não são totalmente

convincentes, bem como não estão totalmente esclarecidas. Embora sejam isoladas de pacientes com diarreia e em vários surtos epidêmicos envolvendo água e alimentos contaminados, não foi possível identificar em muitas amostras associadas com infecções gastrintestinais, um mecanismo de virulência definitivo. Resultados negativos de estudos com voluntários e a falta de resposta intestinal com produção de IgA em pacientes infectados leva a outras dúvidas sobre a enteropatogenicidade da espécie. Portanto, para que seja confirmada a relação de *P. shigelloides* com doença humana há a necessidade de estudos adicionais.

ABSTRACT

Plesiomonas shigelloides: an emergent enteropathogen?

***Plesiomonas shigelloides* is a Gram-negative rod-shaped bacterium, of the family Enterobacteriaceae, which has been isolated from freshwater and salt water, freshwater fish, shellfish and many species of animals. Most human *P. shigelloides* infections are suspected to be waterborne. The organism can be found in untreated water used as drinking water, in recreational water, or in water used to rinse food that is consumed without cooking or heating. The ingestion of *P. shigelloides* does not always cause illness in the host animal, and the organism may be present temporarily as a transient, noninfectious member of the intestinal flora. It has been isolated from the stools of patients with diarrhea, but it is also sometimes isolated from healthy individuals. *P. shigelloides* has been implicated in gastroenteritis, usually a self-limiting disease characterized by fever, chills, abdominal pain, nausea, diarrhea or vomiting; in severe cases the diarrhea may be yellowish-green, foamy and tinged with blood. The bacteria may also cause extra-intestinal infection. Furthermore, it can produce toxins and may be invasive. The evidence in favor of considering *P. shigelloides* as an enteropathogen is not totally convincing. Although it has been isolated from patients with diarrhea and incriminated in some outbreaks involving contaminated water and food, it was not possible, in many *P. shigelloides* samples associated with gastrointestinal infections, to identify a definite mechanism of virulence.**

Keywords: *P. shigelloides*; enteropathogen; gastroenteritis; diarrhea; extraintestinal infections.

REFERÊNCIAS

Abbott SL. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae* In: Murray PR et al. *Manual of clinical microbiology*. 8^a ed. Washington, D.C., ASM Press; 2003. p.684-700.

Abbott SL, Kokka RP, Janda JM. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol* 1991; 29(1):148-53.

Ahmad M, Aggarwal M, Ahmed A. Bloody diarrhea caused by *Plesiomonas shigelloides* proctitis in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Clin Infect Dis* 1998; 27:657.

Albert MJ, Ansaruzzaman M, Qadri F, Hossain A, Kibriya AK, Haider K, Nahar S, Faruque SM, Alam AN. Characterization of *Plesiomonas shigelloides* strains that share type-specific antigens with *Shigella flexneri* 6 and common group 1 antigen with *Shigella flexneri* spp. and *Shigella dysenteriae* 1. *J Med Microbiol* 1993; 39:211-7.

Aldova E, Geizer EA. Contribution to the serology of *Aeromonas shigelloides*. *Zentralbl Bakteriol* 1968; 207:35-40.

Aldova E, Melter O, Chyle P, Slosarek M, Kodym P. *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. *Centr Eur J Publ Health* 1999; 7:172-5.

Aldova E, Shimada T. New O and H antigens of the International Antigenic Scheme for *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol* 2000; 45:301-4.

Aldova E, Schubert RHW. Serotyping of *Plesiomonas shigelloides*: a tool for understanding of ecological relationship. *Med Microbiol Lett* 1996; 5:33-9.

Arai T, Ikejima N, Itoh T, Sakai S, Shimada T, Sakazaki R. A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *J Hyg (Lond)* 1980; 84(2):203-11.

Baratéla KC, Saridakis HO, Gaziri LCJ, Pelayo JS Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on hemolisin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *J Appl Microbiol* 2001; 90(3):482-7.

Billiet J, Kuypers S, van Lierde S, Verhaegen J. *Plesiomonas shigelloides* meningitis and septicaemia in a neonate: report of a case and review of the literature. *J Infect* 1989; 19(3):267-71.

Binns MM, Vaughan S, Sanyal SC, Timmis KN. Invasive ability of *Plesiomonas shigelloides*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1984; 257(3):343-7.

Bozsó J, Durst J, Pásztor A, Svidró A, Szita J. Interpretation of the presence of *Plesiomonas shigelloides* in faecal samples from patients with enteric disease. *Acta Microbiol Hung.* 1986; 33(4):351-4.

Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infection in humans. *Rev Infect Dis* 1988; 10:303-16.

Butt AA, Figueroa J, Martin DH. Ocular infection caused by three unusual marine organisms. *Clin Infect Dis* 1997; 24(4):740.

Cheng CA, Hwang DF, Tsai YH, Chen HC, Jeng SS, Noguchi T, Ohwada K, Hasimoto K. Microflora and tetrodotxin-

- producing bacteria in a gastropod, *Niotha clathrata*. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:929-34.
- Claesson BE, Holmlund DE, Lindhagen CA, Mätzsch TW. *Plesiomonas shigelloides* in a acute cholecystitis: a case report. *J Clin Microbiol* 1984; 20(5):985-7.
- Clark RB, Janda JM. *Plesiomonas* and human disease. *Clin Microbiol Newsl* 1991; 13:49-52.
- Clinical Microbiology Proficiency Testing. 2000. *M94-5 Stool specimen: (No Salmonella, Shigella, Campylobacter, E. coli O157:H7, Aeromonas, Plesiomonas or Yersinia isolated)*. Disponível em URL: http://www.interchange.ubc.ca/cmpt/cmpt_new/m94-5.html, [30 ago 2007].
- Daskaleros PA, Stoebner JA, Payne SM. Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect Immun* 1991; 59:2706-11.
- Delforge ML, Devriendt J, Glupczynski Y, Hansen W, Douat N. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a child primary hemochromatosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21(3):692-3.
- Falcão DP, Lustrri WR, Bauab TM. Incidence of Non-O1 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. *Curr Microbiol* 1998; 37:28-31.
- Falcón R, Carbonell GV, Figueiredo PMS, Saridakis HO, Pelayo JS, Yano T. Intracellular vacuolation induced by culture filtrates of *Plesiomonas shigelloides* isolated from environmental sources. *J Appl Microbiol* 2003; 95:273-8.
- Falcón RM, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatii MS, Yano T. Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem Cell Biol* 2001; 79(4):525-31.
- Farmer III JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. *The Prokaryotes*. 2nd.ed. New York: Springer-Verlag; 1992. p.3012-28.
- Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller, MA. *Manual of clinical microbiology*. 9nd.ed. Washington DC: ASM Press; 2007, p.649-69.
- Ferguson VW, Henderson ND. Description of strain C27: a motile organism with the major antigen of *Shigella sonnei* phase I. *J Bacteriol* 1947; 54:179-81.
- Filizzola JS, Ludovico MS, Yano T. A possible cardiotoxin produced by *Plesiomonas shigelloides*. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences; 2007, Ribeirão Preto, SP, BR. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP; Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007. PI 014.
- Fischer K, Chakraborty T, Hof H, Kirchner T, Wansler O. Pseudoappendicitis caused by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol* 1988; 26(12):2675-7.
- Gardner SE, Fowston SE, George WL. In vitro production of cholera toxin-like activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Infect Dis* 1987; 156(5):720-2.
- Gibotti A. *Enteropatógenos como contaminantes de águas da Bacia do Ribeirão Cambé, Paraná: aspectos epidemiológicos e fatores de virulência*, 1996. [Dissertação] Rio Claro: Instituto de Biociências, UNESP; 1996.
- Gibotti A, Saradakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). *J Appl Microbiol* 2000; 89:70-5.
- González-Rey C. Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments, 2003. [Tese] Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 2003.
- Gordon DL, Philpot CR, McGuire C. *Plesiomonas shigelloides* septic arthritis complicating rheumatoid arthritis. *Aust N Z J Med* 1983; 13(3):275-6.
- Habs H, Schubert RHW. Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von *Pseudomonas shigelloides* (Bader). *Zentralbl Bakteriol* 1962; 186:316-27.
- Henderson DP, Wyckoff EE, Rashidi CE, Verlei H, Oldham AL. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* 2001; 183(9):2715-23.
- Herrington DE, Tzipori S, Robins-Browne RM, Tall BD, Levine MM. In vitro and in vivo pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Infect Immun* 1987; 35(4):979-85.
- Holmberg SD, Wachsmuth K, Hickman-Brenner FW, Blake PA, Farmer III JJ. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann Intern Med* 1986; 105:690-4.
- Holmberg SD, Farmer III JJ. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as cause of intestinal infections. *Rev Infect Dis* 1984; 6(5):633-9.
- Huys G, Sings J. Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 177:83-92.
- Hwang DF, Arakawa O, Saito T, Noguchi T, Simidu U, Tsukamoto K, Shida Y, Hashimoto K. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus*. *Mar Biol* 1989; 100:327-32.
- Ingram CW, Morrison AJ Jr, Levitz RE. Gastroenteritis, sepsis, and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 1987; 25(9):1791-3.
- Islam S, Alam J, Khan SI. Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in various components of pond ecosystems in Dhaka, Bangladesh. *Microbiol Immunol* 1991; 35:927-32.

Plesiomonas shigelloides

- Jagger TD. *Plesiomonas shigelloides* - a veterinary perspective. *Rev Infect Dis* 2000; 2(4):199-210.
- Janda JM. Genus XXXVII. *Plesiomonas* Habs and Schubert 1962. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd.ed. New York. Springer-Verlag; 2005. vol. 2, Parte B. p.740-4.
- Janda JM, Abbott SL. Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5):1206-8.
- Jiang ZD, Nelson AK, Mathewson JJ, Ericsson CD, DuPont HL. Intestinal secretory immune response to infection with *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* among students from the United States in Mexico. *J Infect* 1991; 164:979-82.
- Kayano PA, Ludovico MS, Yano T. Cell adhesion of *Plesiomonas shigelloides*. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences; 2007; Ribeirão Preto, BR. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007. PI 057.
- Kennedy CA, Goetz MB, Mathisen GE. Postoperative pancreatic abscess due to *Plesiomonas shigelloides*. *Rev Infect Dis* 1990; 12(5):813-6.
- Kirov SM. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: Doyle MP et al. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2nd.ed. Washington, DC.: ASM Press; 2001. p.301-27.
- Körner RJ, MacGowan AP, Warner B. The isolation of *Plesiomonas shigelloides* in polymicrobial septicaemia originating from the biliary tree. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 277(3):334-9.
- Krovacek K, Eriksson LM, González-Rey C, Rosinsky J, Ciznar I. Isolation, biochemical and serological characterization of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. *Comp Immuno, Microbiol Infect Dis* 2000; 23:45-51.
- Leitão MFF, Silveira NFA. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças no Estado de São Paulo. *Colet Ital* 1991; 21: 90-9.
- Lim YS, Young LJ, Balakrishnan S. *Plesiomonas shigelloides* associated with diarrhoeal disease in Malaysian children. *Singapore Med J* 1987; 68(6):534-6.
- Lopez-Sabater EI, Rodriguez-Jerez JJ, Hernandez-Herrero M, Mora-Ventura MT. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Int J Food Microbiol* 1996; 28:411-8.
- Malachias DQ, Ludovico MS, Yano T. A heat-labile cytotoxin and apoptosis induction produced by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences; 2007; Ribeirão Preto, SP, BR. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007. PI 016.
- Manorama TV, Agarwal RK, Sanyal SC. Enterotoxins of *Plesiomonas shigelloides*: partial purification and characterization. *Toxicon Suppl* 1983; 3:269-72.
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:412-21.
- Middlebrooks BL, Toom PM, Douglas WL, Harrison RE, McDowell S. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel. *J Food Sci* 1988; 53:1024-9.
- Miller ML, Kohburger JA. *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and waterborne pathogen. *J Food Prot* 1985; 48:449-57.
- Miyahara M, Nakajima K, Shimada T, Mise K. Restriction endonuclease PshAI from *Plesiomonas shigelloides* with the novel recognition site 5'-GACNN/NNGTC. *Gene* 1990; 87(1):119-22.
- Mondino SSB, Nunes MP, Ricciardi ID. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90:1-4.
- Monteiro-Neto V, Santos LMS. *Isolamento de Plesiomonas shigelloides* em crianças com disenteria prolongada. In: XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1993. Santos, SP, BR: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1993. p.119.
- Narita H, Matsubara S, Miwa N, Akahane S, Murakami M, Goto T, Nara M, Noguchi T, Saito T, Shida Y, Hashimoto K. *Vibrio alginolyticus*, a TTX producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Nippon Suisan Gakkai Shi* 1987; 53:617-21.
- Okawa Y, Ohtomo Y, Tsugawa H, Matsuda Y, Kobayashi H, Tsukamoto T. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain. *FEMS Microbiol Letters* 2004; 239:125-30.
- Olsvik O, Wachsmuth K, Kay B, Birkness KA, Yi A, Sack B. Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains isolated from children with diarrhea in Peru. *J Clin Microbiol* 1990; 28(5):886-9.
- Pasquale V, Krovacek K. Isolamento di *Plesiomonas shigelloides* da ambienti marini costieri. *Biologi Ital* 2001; 6:47-50.
- Penn RG, Giger DK, Knoop FC, Preheim CL. *Plesiomonas shigelloides* overgrowth in the small intestine. *J Clin Microbiol* 1982; 15(5):869-72.
- Pitarangsi C, Echeverria P, Whitmire R, Tirapat C, Formal S, Dammin GJ, Tingtalapong M. Enteropathogenicity of

Plesiomonas shigelloides

- Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. *Infect Immun* 1982; 35(2):666-73.
- Ramaiah N, Hill RT, Chun J, Ravel J, Matte MH, Straube WL, Colwell RR. Use of a *chiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol Ecol* 2000; 34:63-71.
- Riley PA, Parasakthi N, Abdullah WA. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a child with leukemia. *Clin Infect Dis* 1996; 23(1):206-7.
- Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:416-26.
- Rust L, Messing CR, Iglewski BH. Elastase assays. In: Clark VL, Bavoil PM. *Methods in enzymology: bacterial pathogenesis*. Part A: identification and regulation of virulence factors. London: Academic Press; 1994. p.554-62.
- Rutala WA, Sarubi FA Jr, Finch CS, McCormack JN, Steinkraus GE. Oyster-associated outbreak of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *Lancet* 1982; 1:739.
- Santos JA, Gonz ales CJ, L opes TM, Otero A, Garcia-L opes ML. Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. *J Food Prot* 1999; 62(12):1475-7.
- Sanyal SC, Saraswathi B, Sharma P. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *J Med Microbiol* 1980; 13:401-9.
- Sanyal SC, Singh SJ, Sen PC. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J Med Microbiol* 1975; 8:195-8.
- Saraswathi B, Agarwal RK, Sanyal SC. Further studies on enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Indian J Med Res* 1983; 78:12-8.
- Schubert RHW, Beichert R. The influence of treated sewage effluents on the numbers of *P. shigelloides* isolated from river waters. *Hyg Med* 1993; 18:57-9.
- Schubert RH, Holz-Bremer A. Cell adhesion of *Plesiomonas shigelloides*. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1999; 202(5):383-8.
- Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Kosako Y, Inoue K, Ahengshi Y, Aldova E. New O and H antigens of *Plesiomonas shigelloides* and their O antigenic relationships to *Shigella boydii*. *Curr Microbiol* 1994; 28:351-4.
- Shimada T, Sakazaki R. One the serology of *Plesiomonas shigelloides*. *Jpn J Med Sci Biol* 1978; 31:135-42.
- Simidu U, Noguchi T, Hwang DF, Shida Y, Hashimoto K. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53:1714-5.
- Stock I, Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:803-11.
- Taylor DN, Echeverria P. Etiology and epidemiology of travelers' diarrhea in Asia. *Rev Infect Dis*. 1986; 8:136-41.
- Theodoropoulos C, Wong TH, O'Brien M, Stenzel D. *Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an in vitro model system. *Infect Immun* 2001; 69(4):2260-9.
- Tsukamoto T, Kinoshita Y, Shimada T, Sakazaki R. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *J Hyg* 1978; 80:275-80.
- van Loon FPL, Rahim Z, Chowdhury KA, Kay BA, Rahman SA. Case reporte of *Plesiomonas shigelloides* - associated persistent dysentery and pseudomembranous colitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27(8):1913-5.
- Vitovec J, Aldova E, Vladik P, Krovacek K. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas* spp. in experimental mono-and coinfection with *Cryptosporidium parvum* in the intestine of neonatal BALB/mice. *Immunol Mircobiol Infect Dis* 2001; 24:39-55.
- Wei HF, Wu PH, Chas TY, Chen KT, Hwang DF, Horng CB. A snail poisoning outbreak in Fangliao, Pintung County. *Epidemiol Bull* 1994; 10:115-22.
- Yoshida M, Nakamura N, Horikoshi K. Production of trehalose by a dual enzyme system of immobilized maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase. *Enzyme Microb Technol* 1998; 22:71-5.
- Yoshinaga DH, Frank HA. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl Environ Microbiol* 1982; 44:447-52.