



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA – BIOLOGIA GERAL

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LINHAGENS
INVASIVAS DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*
UTILIZANDO O MÉTODO MLST**

SARAH CAROLINA ZANETTI E VIGUETTI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BELO HORIZONTE – MG

2/2010

SARAH CAROLINA ZANETTI E VIGUETTI

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LINHAGENS
INVASIVAS DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*
UTILIZANDO O MÉTODO MLST**

ORIENTAÇÃO: VASCO AZEVEDO

CO - ORIENTAÇÃO: LUIS G. C. PACHECO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BELO HORIZONTE, 2010

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE GENÉTICA
CELULAR E MOLECULAR – UFMG EM PARCERIA COM AS INSTITUIÇÕES
SCHOOL OF LIFE SCIENCES, UNIVERSITY OF WARWICK, REINO UNIDO E
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL.**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e a minha família que sempre estiveram ao meu lado iluminando o caminho da minha vida, e à minha nova família que está por vir, o qual espero poder fazer o mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o meu orientador Prof. Vasco Azevedo pela oportunidade de crescimento profissional e pela confiança depositada;

Ao Luis Pacheco, meu co-orientador, pelo apoio, paciência e dedicação sem os quais o desenvolvimento deste trabalho não seria possível, chefinho não tenho palavras, muito obrigada mesmo;

Ao amigo Siomar pela enorme ajuda durante a realização deste trabalho, sem você seria impossível este trabalho sair do papel. Siomas, nunca vou esquecer o que você fez por mim, obrigada;

À amiga Fernanda Dorella, que mesmo de longe esteve ao meu lado;

À amiga Pamela Mancha pelo companheirismo e apoio sempre que necessário, quero levar você para sempre comigo, minha amiga argentina;

Aos meus colegas de LGCM, vocês são ótimos. Sentirei saudades;

Não posso deixar de agradecer eu meu ex-orientador Anderson Miyoshi pelos muitos ensinamentos, você é um grande professor para mim, me orgulho muito de ter sido sua aluna, muito obrigada;

À Universidade Federal de Minas Gerais, à Pós Graduação em Genética bem como seus professores pela formação profissional ao longo destes anos, desde a Iniciação Científica ao fim do Mestrado;

À banca examinadora por ter aceitado o convite;

Aos colaboradores por tornarem este projeto possível;

A todos, muito obrigada.

*Chega um momento em que temos que escolher o que é
o certo e o que é o mais fácil.*

Alvo Dumbledore

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE GRÁFICOS	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 O gênero <i>Corynebacterium</i>	4
1.2 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	4
1.2.1 Biotipos de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	5
1.2.2 O Genoma de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	5
1.2.3 Toxina Diftérica.....	6
1.3 Difteria (A doença).....	9
1.3.1 Importância da Doença.....	10
1.3.2 A difteria no Brasil.....	11
1.3.3 Tratamento.....	14
1.3.4 Vacinação.....	15
1.4 Novos aspectos da difteria: infecções causadas por linhagens não-toxigênicas e por <i>Corynebacterium ulcerans</i>	16
1.4.1 Linhagens atoxigênicas de <i>C. diphtheriae</i>	16
1.4.2 Difteria causada por <i>Corynebacterium ulcerans</i>	16
1.5 Tipagem de linhagens de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	18
1.5.1 Tipagens de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> baseadas em perfis eletroforéticos.....	18
1.5.1.1 RAPD.....	18
1.5.1.2 PFGE.....	18
1.5.1.3 AFLP.....	19
1.5.1.4 PCR - RFLP.....	20

1.5.2 Análises comparativas entre os diferentes métodos de tipagem molecular.....	20
1.5.3 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	22
1.5.4 Estudos epidemiológicos da difteria no mundo.....	25
1.6 Epidemiologia molecular de linhagens invasivas de <i>C. diphtheriae</i>	26
1.6.1 Linhagens invasivas.....	26
1.6.2 Tipagem molecular de linhagens invasivas.....	28
1.6.3 Linhagens invasivas brasileiras.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. METODOLOGIA.....	35
4.1 Linhagens e condições de cultivo.....	36
4.2 Biologia Molecular.....	38
4.2.1 Extração de DNA genômico das culturas bacterianas.....	38
4.2.2 Dosagem do DNA genômico extraído.....	39
4.2.3 Caracterização bioquímica dos isolados.....	39
4.2.3.1 Sistema comercial API Coryne.....	40
4.3 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	40
4.3.1 Seleção dos genes <i>housekeeping</i>	40
4.3.2 Iniciadores utilizados neste estudo.....	42
4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.3.4 Reação de sequenciamento.....	44
4.4. Análises bioinformáticas.....	44
4.4.1 Banco de dados MLST de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	44
4.4.2 Designação dos alelos.....	45
4.4.3 Ferramentas bioinformáticas utilizadas para análises MLST.....	45

4.4.4 Análises de eBURST.....	46
4.4.5 Cálculo do Índice de associação.....	46
4.4.6 Análise de decomposição dos <i>splits</i>	47
4.4.7 Análises filogenéticas.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Parte I - Artigo.....	49
5.2 Parte II - Resultados adicionais.....	60
5.2.1 Amplificação dos genes <i>housekeeping</i> de <i>C. diphtheriae</i>	60
5.2.1.1 Reação em cadeia da polimerase.....	60
5.2.2 Novos alelos de <i>C. diphtheriae</i> encontrados.....	61
5.2.2.1 Novas ST's identificadas em linhagens invasivas.....	61
5.2.3. Alto potencial recombinogênico das linhagens.....	62
5.2.4 Linhagem I de <i>C. diphtheriae</i>	63
5.2.5 Análises de grupamentos clonais.....	66
5.2.6 Análises filogenéticas.....	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
7.1 CONCLUSÕES.....	77
7.2 PERSPECTIVAS.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9. ANEXO.....	
9.1 Currículo Lattes.....	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INSTITUIÇÕES

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

TERMOS TÉCNICOS

DNA	Ácido Desoxiribonucléico
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Micromolar
mod	Modificado
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ng	Nanograma

Índice

q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
seg	Segundos
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Temp	Temperatura

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura cristalográfica da toxina diftérica mostrando os três domínios (C, R e T).....	7
FIGURA 1.2. Mecanismos de ação da toxina diftérica.....	8
FIGURA 4.1 Imagem da <i>homepage</i> pubmlst para <i>C. diphtheriae</i>	45
FIGURA 5.1. Amostras provenientes da PCR feita para confirmar a amplificação dos genes.....	60
FIGURA 5.2. Imagem do <i>la</i> obtido em cada uma das análises feitas no programa LIAN 3.5.....	62
FIGURA 5.3. Árvore de decomposição gerada pelo programa <i>Splits Decomposition</i>	65
FIGURA 5.4. Imagem gerada pelo programa eBURST (mod).....	67
FIGURA 5.5. Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA v4.	70

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.1. Casos reportados de difteria anualmente em todo o mundo e abrangência da vacina DTP no período de 1980 a 2008.....	13
GRÁFICO 1.2. Coeficiente de incidência da difteria e cobertura vacinal pela DTP no Brasil.....	14

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Organismos que já possuem banco de dados para armazenar os resultados gerados pela técnica de MLST.....	24
TABELA 4.1. Relação das linhagens utilizadas no trabalho e suas características clínicas e microbiológicas.....	37
TABELA 4.2. Características principais dos sete genes <i>housekeeping</i> selecionados para a análise de MLST.....	41
TABELA 4.3. Iniciadores usados para a PCR e sequenciamento dos sete genes <i>housekeeping</i> de <i>C. diphtheriae</i>	42
TABELA 4.4. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR.....	43
TABELA 5.5. Condições da reação de PCR.....	43
TABELA 5.1. Relação dos alelos encontrados para cada um dos sete genes utilizados nas análises de sequenciamento.....	61
TABELA 5.2. Resultado bruto obtido a partir do perfil alélico de cada linhagem. As ST's em amarelo representam novas ST's geradas pelo banco de dados.....	64

RESUMO

A difteria é considerada por várias agências de saúde internacionais como uma doença re-emergente. A forma clássica da doença, causada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, afeta primariamente o trato respiratório superior. No entanto, existem alguns isolados desta bactéria capazes de causar infecções invasivas, como endocardite. No Brasil, linhagens de *C. diphtheriae* causadoras deste tipo de infecção têm sido isoladas nos últimos anos. Estas linhagens foram capazes de infectar pessoas vacinadas com o toxóide diftérico (DT) e suas principais características distintivas foram, na maioria dos casos, a capacidade de fermentar sacarose e o perfil não-toxigênico. A escassez de informações sobre os mecanismos que levam ao fenótipo invasivo evidencia a necessidade de estudos genéticos desta sub-população de *C. diphtheriae*. O objetivo do presente estudo foi realizar uma análise epidemiológica molecular destas linhagens invasivas brasileiras, utilizando a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Um esquema de MLST padronizado para tipagem de *C. diphtheriae* foi utilizado, composto por sete genes *housekeeping* desta bactéria: *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, e *rpoB*. Como controles, foram tipadas linhagens padrão de *C. diphtheriae*. Os resultados obtidos foram comparados com perfis de MLST de grupos clonais de *C. diphtheriae* isolados em diferentes países, os quais estão depositados no banco de dados PubMLST. Os perfis obtidos para as linhagens invasivas foram divididos em três complexos clonais pelo programa eBURST. As linhagens foram consideradas como sendo de um mesmo complexo clonal quando pelo menos seis dos sete alelos estudados no MLST eram compartilhados. As linhagens brasileiras do biotipo *gravis* agruparam-se em complexos clonais com cepas originárias da Europa, indicando uma circulação mundial dos clones deste biotipo e alta estabilidade genética. Por outro lado, linhagens invasivas do biotipo *mitis* apresentaram maior diversidade genética e uma circulação aparentemente associada à América do Sul. As análises realizadas sugerem que a alta diversidade genética encontrada para as linhagens invasivas é devida a um elevado potencial recombinogênico dos isolados.

ABSTRACT

Diphtheria is a reemerging disease worldwide. The classic form of the infection, caused by the bacterium *Corynebacterium diphtheriae*, primarily affects the upper respiratory tract. However, there are some strains of this bacterium that can cause invasive infections such as endocarditis. In Brazil, strains of *C. diphtheriae* causing this type of infection have been isolated in recent years. These strains were able to infect vaccinated and non-vaccinated individuals. The main distinguishing features of the invasive strains were mostly the ability to ferment sucrose and the non-toxicogenic profile. The mechanisms leading to the invasive phenotype are poorly understood; this demonstrates the need for genetic studies of this subpopulation of *C. diphtheriae*. The aim of this study was to perform a molecular epidemiological analysis of the invasive *C. diphtheriae* strains isolated in Brazil, using the Multilocus Sequence Typing (MLST) method. A standardized MLST scheme for typing this bacterium was used, composed of seven housekeeping genes: *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, e *rpoB*. Type strains of *C. diphtheriae* were used as controls. The results obtained were compared with MLST profiles of strains isolated in different countries, which are accessible in the public database PubMLST. The profiles obtained for the invasive strains were divided into three clonal complexes by eBURST program. The strains were considered to be of the same clonal complex when at least six of the seven alleles studied in the MLST were shared. The Brazilian strains of biotype *gravis* were grouped into clonal complexes with strains from Europe, indicating a worldwide circulation of clones of this biotype and some genetic stability. Moreover, invasive strains of biotype *mitis* had a higher genetic diversity and an apparently associated with movement within South America. Analyzes suggest that high genetic diversity found among the invasive strains is due to a high recombinogenic potential of the isolates.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* foi originalmente criado por Lehman & Neumann (1896) para acomodar o bacilo *Corynebacterium diphtheriae* e algumas outras espécies patogênicas. Posteriormente, o grupo passou a acomodar diversas outras espécies de bactérias que diferiam em forma, patogenicidade e esporulação (Pascual et al., 1995).

Neste gênero pode-se destacar *Corynebacterium glutamicum*, altamente utilizada na produção de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina (Koffas and Stephanopoulos, 2005); *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da Linfadenite Caseosa, doença de importância veterinária (Dorella et al., 2006); *Corynebacterium jeikeium*, microrganismo responsável por infecções nosocomiais em humanos (Tauch et al., 2005) e a *C. diphtheriae*, agente causador da difteria (Cerdeño-Tarraga et al., 2003).

Este gênero bacteriano pertence a um grupo de bactérias conhecido como CMN. Este é um grupo supragenérico pertencente à classe das Actinobactérias no qual também estão inseridos os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As características mais importantes das bactérias deste grupo são: presença de ácido micólico na parede celular (22 a 36 átomos de carbono) e variado conteúdo G + C (47 a 74%) nos genomas (Ventura et al., 2007).

1.2 *Corynebacterium diphtheriae*

C. diphtheriae é uma bactéria patogênica em forma de bacilo, Gram-positiva, aeróbia, não-esporulante e imóvel (Cerdeño-Tárraga et al., 2003). Esta pode ser isolada de diferentes hospedeiros, como cavalos (Leggett et al., 2010), gatos domésticos com otite severa (Hall et al., 2010) e cachorros (Dixon, 2010), porém seu principal hospedeiro é o homem.

1.2.1 Biotipos de *Corynebacterium diphtheriae*

Baseado principalmente em propriedades bioquímicas, *C. diphtheriae* foi identificada como apresentando quatro biotipos (BT): *mitis*, *gravis*, *intermedius* e *belfanti*, citados em grau de severidade da infecção que podem causar (Efstratiou et al., 2000). Uma característica comum a todos os BT, com exceção do *gravis*, é a presença de uma pequena área de β -hemólise ao redor das colônias crescidas em meio sólido com sangue. Outra característica importante desta espécie bacteriana é que os BT *belfanti* e *mitis* produzem, tipicamente, uma colônia opaca, enquanto *intermedius* geram colônias translúcidas e brilhantes. Já os isolados *gravis* são amorfos e opacos (Efstratiou et al, 2000). O BT *belfanti* é nitrato positivo, enquanto *gravis* é capaz de fermentar amido e *intermedius* dextrina (Funke et al., 1997). Análises morfológicas podem ser utilizadas para discriminação dos biotipos porém são eficientes somente na identificação do BT *intermedius*, uma vez que as colônias destas linhagens são menores (0.5 - 1 μ m) em relação aos outros (1.5 - 2 μ m) (Efstratiou et al., 2000).

1.2.2 O genoma de *Corynebacterium diphtheriae*

Cerdeño-Tárraga e colaboradores (2003) sequenciaram o genoma da linhagem NCTC 13129 de *C. diphtheriae*, BT *gravis*, relacionada a um surto de difteria na União Soviética, na década de 90. O genoma desse organismo consiste em um cromossomo circular de 2.488.635 pares de base. O seu conteúdo GC é de 53,5%.

Existem diversas proteínas que podem ser responsáveis pela sintomatologia da doença. Estas são codificadas por genes localizados dentro das “ilhas de patogenicidade” (PAIs). Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1990 para descrever grandes regiões instáveis dentro do cromossomo de algumas linhagens patogênicas de *Escherichia coli*. Atualmente, o termo é usado para descrever regiões

Introdução

cromossômicas que foram adquiridas pelo organismo por transferência horizontal de genes que contenham diferente conteúdo G+C e que codificam fatores de virulência de bactérias patogênicas (Gal-Mor & Finlay, 2006). As PAIs de *C. diphtheriae* possuem prováveis regiões de sistema de transporte de ferro, proteínas exportadas, proteínas de sistema de dois componentes (reguladora e sensora), transposase de seqüências de inserção (elementos IS), além de outras regiões que são provenientes de corynefagos.

O principal gene presente nessas ilhas, responsável pelos efeitos causados pela bactéria, é o que codifica a proteína DT (gene *tox*), uma toxina encontrada em corynefagos lisogênicos β *tox+*, γ *tox+* e ω *tox+*, e que também está presente em uma ilha de patogenicidade no genoma de *C. diphtheriae*.

1.2.3 Toxina diftérica

A toxina diftérica (DT) é uma potente exotoxina protéica, considerada o mais importante fator de virulência de *C. diphtheriae* (Cerdeño-Tárraga et al., 2003). A DT é um peptídeo dimérico de 535 resíduos que, quando clivado, pode gerar dois fragmentos A e B (Collier e Kandell, 1971; Moskaug et al., 1989).

Ao ser secretada, a proteína é clivada nos fragmentos A e B, que estão unidos por pontes dissulfeto (Choe et al., 1992). Análises realizadas por cristalografia de raios-X, feita por Choe e colaboradores em 1992, revelaram que a DT possui uma conformação em Y com três domínios distintos: C, T e R (Fig. 1.1); estes domínios são relativos às funções principais da toxina: catalisação, translocação e ligação ao receptor específico, respectivamente. O domínio C pertence ao fragmento A e os domínios T e R ao fragmento B.

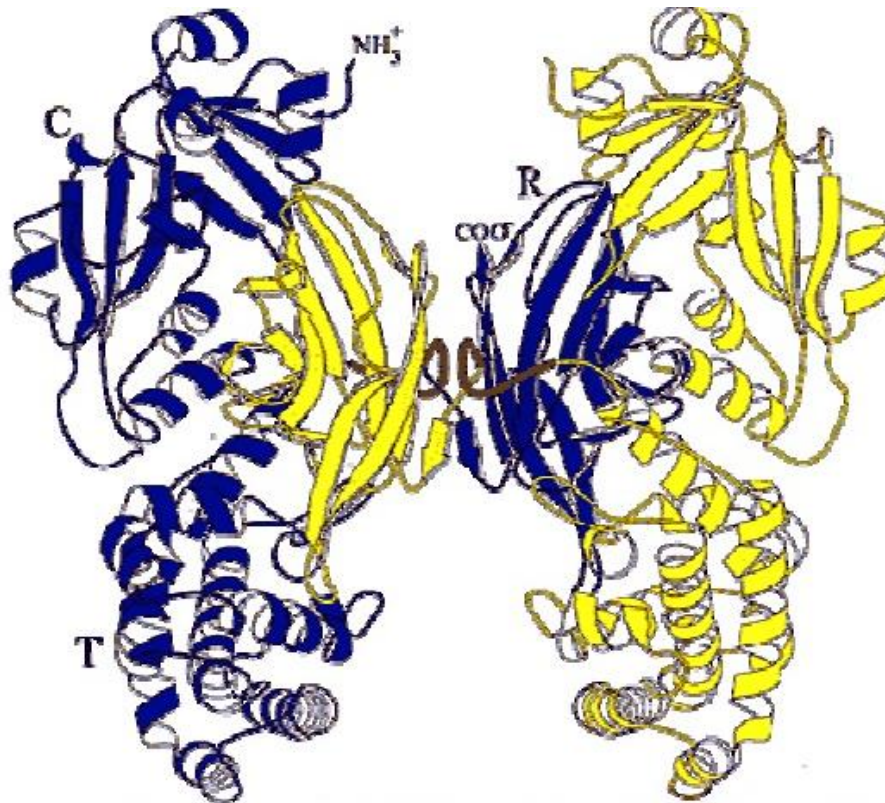


FIGURA 1.1 Estrutura cristalográfica da toxina diftérica mostrando os três domínios (C, R e T). Modificado de Bolt, 2009.

Primeiramente, o receptor (R) se liga a um receptor específico (HB-EGF precursor) das células do hospedeiro. Ao translocar (T) pelo caminho do endossomo, a DT é exposta a um pH ácido (5.0) e muda sua conformação. É importante ressaltar que a interação toxina diftérica—HB-EGF favorece a endocitose, representando uma etapa importante para a expressão da toxicidade da molécula (Lemichez et al., 1997). O domínio T é responsável por penetrar a membrana, levando a uma clivagem e subsequente translocação do domínio catalítico para o citoplasma (Fig. 1.2) (Dorland et al., 1979; Keen et al., 1982; Naglich et al., 1992a; Naglich et al., 1992b; Blewitt et al., 1985; Moskaug et al., 1991).

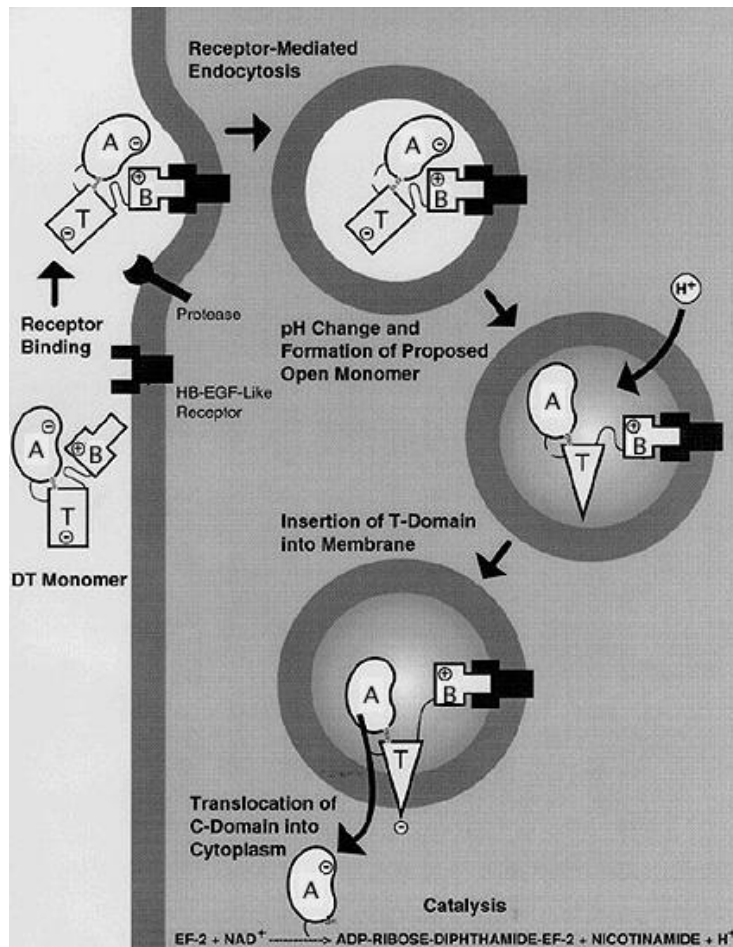


FIGURA 1.2 Mecanismo de ação da toxina diftérica (DT). O repressor presente no domínio B se liga ao receptor celular HB-EGF-like, então a DT transloca pelo caminho do endossomo. Ao ser exposta à um pH ácido, ela muda sua conformação. O domínio T ajuda na clivagem e liberação do domínio catalítico para o citoplasma, o que irá gerar um bloqueio na síntese de proteínas.

Figura retirada da *homepage* do departamento de bacteriologia da Universidade de Wisconsin-Madison.

<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/diphtheria>.

A exotoxina atua estimulando a ribosilação da adenosina difosfato inativando o fator 2 de alongação da síntese protéica e, por conseguinte, inibindo a síntese celular de proteínas. A toxina diftérica também possui uma atividade de nuclease estimulada por Ca^{++} e Mg^{++} em que a toxina ataca o DNA cromossômico diretamente para iniciar a lise celular (Hadfield et al., 2000).

O gene codificador de DT é diretamente regulado pelo repressor DtxR (do inglês, *diphtheria toxin repressor*), que faz parte de um grupo de proteínas reguladoras

Introdução

dependentes de metal (Oram et al., 2002). DtxR bloqueia a transcrição ligando-se ao Operador *tox* ao ser ativado por íons de metais pesados divalentes. Variantes de *tox* ou DtxR podem estar associadas com variações nos níveis de produção da toxina (Nakao et al., 1996). Até mesmo substituições únicas, principalmente na região amino-terminal do DtxR, podem levar à perda da atividade repressora, pois nessa região estão localizados os domínios de ligação a metais e de reconhecimento do DNA. Essas mutações causam diminuição da afinidade de ligação ao operador *tox* em relação ao DtxR selvagem (Wang et al., 1994). Apesar de *DtxR* não ser um gene essencial para *C. diphtheriae*, ele apresenta um papel importante na regulação de genes envolvidos em aquisição de ferro e proteção da célula contra danos causados por estresse oxidativo (Oram et al., 2002). Além disso, DtxR está diretamente envolvido na modulação de propriedades adesivas e expressão de carboidratos de superfície. O ferro tem um papel regulatório na adesão de *C. diphtheriae* às células do trato respiratório humano e aos eritrócitos. A limitação de ferro intensifica a auto-agregação e aderência aos eritrócitos (Moreira et al., 2003).

1.3 Difteria (a doença)

A difteria é uma doença bacteriana aguda causada pela *Corynebacterium diphtheriae*. Esta doença é transmitida através de gotículas de secreção respiratória que podem ser eliminadas ao falar, tossir ou espirrar, e por contato pessoal entre uma pessoa doente ou portadora da bactéria (Ministério da Saúde); a doença caracteriza-se por afetar principalmente a mucosa do trato respiratório superior de crianças.

C. diphtheriae apresenta um período de incubação de, geralmente, dois a cinco dias (De Zoysa and Efstratiou, 2006), levando de um a sete dias para se multiplicar sobre a superfície da membrana que se desenvolve na região das tonsilas, úvula, palato mole, orofaringe e nasofaringe. Além disso, ela forma uma “pseudomembrana” branca, que se torna cinza, podendo apresentar um aspecto necrótico e causar

obstrução respiratória severa (Hadfield et al., 2000). A difteria também pode causar danos como; neurite e miocardite aguda, com falha congestiva e colapso circulatório, dispnéia progressiva e fraqueza (Mattos-Guaraldi et al., 2004). Embora a maioria dos casos seja leve, a taxa de mortalidade da doença é de 5 a 10% (Haslesy, 1998)

1.3.1 Importância da doença

A difteria é considerada uma doença reemergente em todo o mundo. (Popovic et al., 2000). No começo do século XX, a difteria se tornou um grande problema, pelo número de mortos; de 1920 a 1934 foram 800.000 casos e 50.000 mortes na Inglaterra e País de Gales (Efstratiou and George, 1996). Grandes surtos de difteria ocorreram nos anos 1990 por toda a Rússia e demais estados da ex-União Soviética. Apesar da imunização com a vacina DTP (do inglês, *diphtheria-tetanus toxoids pertussis*), a difteria permanece endêmica em várias regiões incluindo países da África, Ásia, Oriente Médio, regiões da América do Sul, entre elas o Brasil, e, na Europa, Albânia e todos os países da ex-União Soviética (CDC março, 02, 2008, http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/diphtheria_t.htm). Medidas de controle foram implementadas, porém o risco de difteria permanece em todas essas áreas.

Foram relatados mais de 150.000 novos casos de difteria em todos os 15 países da antiga União Soviética na década de 1990, sendo que a Rússia foi responsável por 75% dos casos (Popovic et al., 2000). Somente no ano de 1994 ocorreram 47.802 casos que levaram a 1.746 mortes nesses países e a incidência continuou aumentando no ano de 1995 (Nakao et al., 1996). Mais recentemente, em 2009, a Organização Mundial de Saúde (WHO) recebeu relatos de 12.000 casos de difteria em todo o mundo (Gráfico 1.1). Aproximadamente 80% dos casos foram provenientes da Índia, provavelmente devido ao baixo índice de vacinação neste país em 2003 (Sharma et al., 2007).

Introdução

Embora os motivos da reemergência de difteria nesses países não sejam totalmente compreendidos, há hipóteses que levam em conta a introdução de linhagens toxigênicas de um novo BT, baixos níveis de imunização em bebês e crianças, diminuição da imunidade induzida por vacina em adultos e o aumento dos movimentos populacionais responsáveis pela disseminação de *C. diphtheriae* a partir de locais endêmicos. Além disso, o crescimento populacional e condições de higiene precárias também contribuem para a transmissão do microrganismo (Nakao et al., 1996; Popovic et al., 2000; Mattos-Guaraldi et al., 2004). Outro fato importante que pode caracterizar a reemergência da doença são os casos em que ela pode ser manifestada por outro agente causador, a *Corynebacterium ulcerans*. Outras hipóteses como variações potenciais nos fatores de virulência também devem ser consideradas. A imunização reduz substancialmente o risco de desenvolver difteria, mas não previne casos assintomáticos de linhagens toxigênicas ou faringites e infecções invasivas causadas por linhagens atoxigênicas (Pallen et al., 1994).

1.3.2. A difteria no Brasil

O número de casos de difteria notificados no Brasil vem decrescendo progressivamente, provavelmente em decorrência do aumento da utilização da vacina DTP. Porém a difteria ainda incide preponderantemente entre crianças na idade pré-escolar, especialmente naquelas não imunizadas com o esquema básico da vacina DTP. Quando a cobertura vacinal com DTP é acima de 80% em crianças, pode ocorrer o deslocamento da incidência para outras faixas etárias em pessoas não vacinadas (<http://www.funasa.gov.br>). Portanto, é importante que a cobertura vacinal no Brasil seja mais abrangente para as diferentes faixas etárias, em virtude do aumento das viagens internacionais e da emergência de clones epidêmicos.

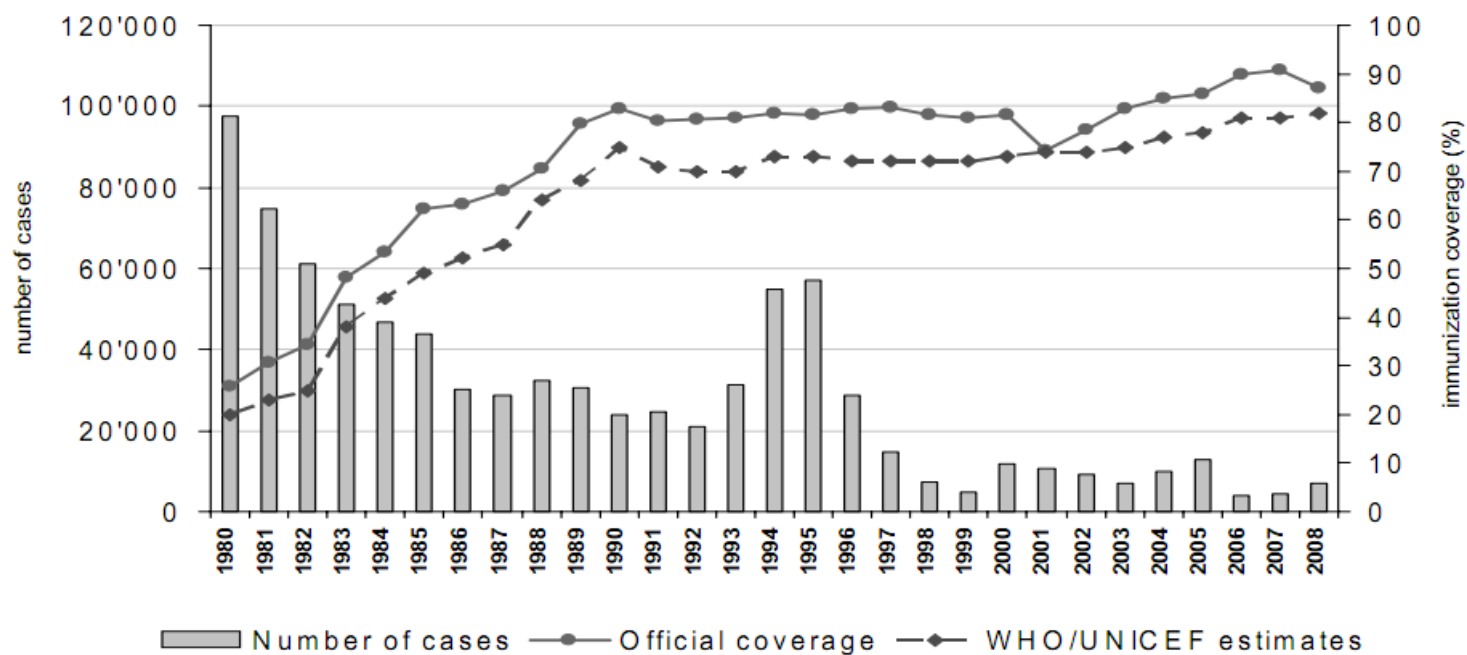
De 1980 a 1990, o microrganismo ocasionou surtos esporádicos em poucas regiões do território nacional, sendo estes notificados apenas no Piauí, Ceará, Rio

Introdução

Grande do Norte, Pernambuco, Amazonas e Santa Catarina. O número de notificações nesta época estava longe dos relatados na década de 70 (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Formiga & Mattos-Guaraldi, 1993). A mortalidade predominou no grupo de crianças não vacinadas ou parcialmente imunizadas (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991). As razões para a incidência nestas regiões são explicadas pelas precárias condições de higiene e saneamento básico, assim como pela imunização incompleta da população (Macambira et al., 1994).

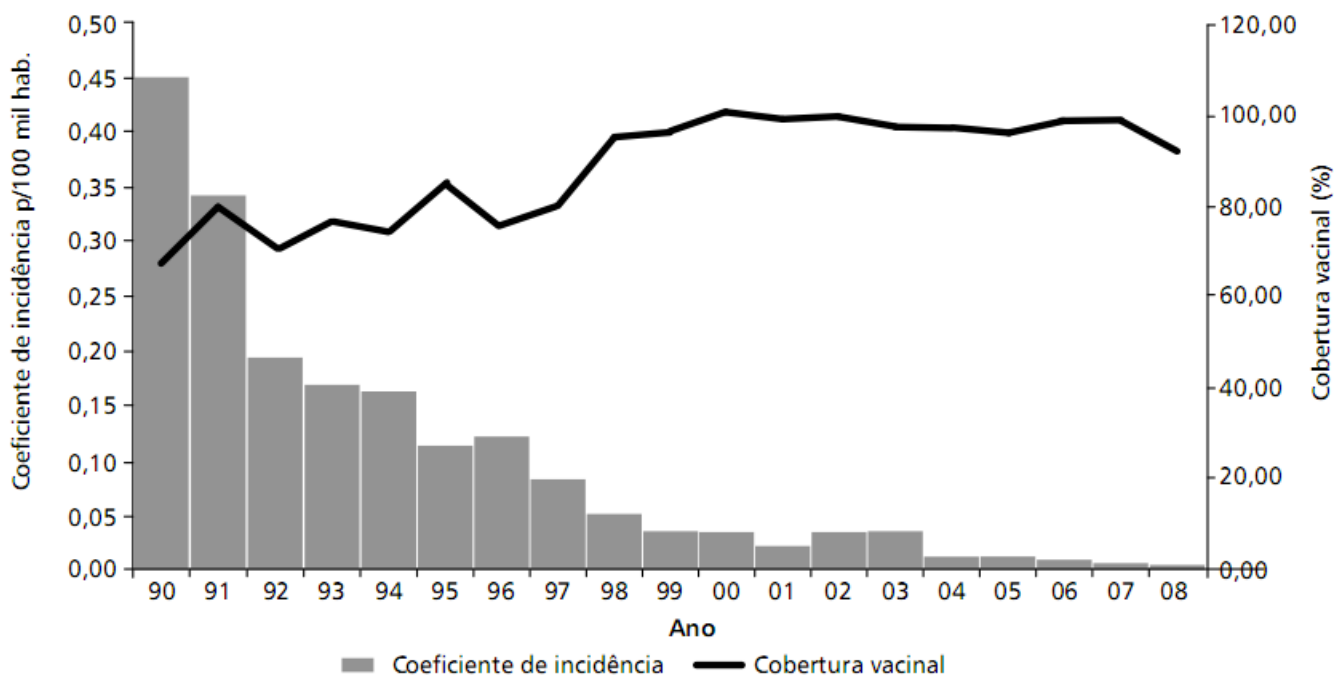
Segundo o Ministério da Saúde, em 1990, foram notificados 640 casos (0,45/100.000 habitantes), número que foi progressivamente decaindo até atingir 56 casos em 1999 (0,03/100.000 habitantes) e 58 casos em 2000 (0,03/100.000 habitantes). Nos anos subsequentes, o número de casos não ultrapassou 50 por ano e o coeficiente de incidência por 100.000 habitantes manteve-se em torno de 0,03. Em 2008, foram confirmados sete casos da doença (0,003/100.000 habitantes) (Gráfico 1.2). Contudo, apesar da queda acentuada na incidência da difteria na população, o Brasil está muito distante de atingir o controle alcançado pelos países desenvolvidos. Enquanto nos Estados Unidos foram notificados cerca de quatro casos anuais em crianças, no Brasil este número, entre 1993 e 1998, foi cerca de 40 vezes superior (Boletim Epidemiológico, 1999).

Gráfico 1.1 Casos repostados de difteria anualmente em todo o mundo e abrangência da vacina DTP no período de 1980 a 2008. SISTEMA DE MONITORAMENTO DE VACINAÇÃO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE



Introdução

Gráfico 1.2 Coeficiente de incidência da difteria e cobertura vacinal pela DTP. Brasil, 1990-2008
MINISTÉRIO DA SAÚDE - VIGILÂNCIA DA SAÚDE EPIDEMIOLÓGICA, CADERNO 3.



Fonte: SVS/MS

1.3.3 Tratamento

O tratamento para pacientes com suspeita de difteria envolve isolamento dos mesmos e administração de soro antidiftérico, que tem por finalidade inativar a DT circulante, porém este não tem efeito sobre a toxina já impregnada no tecido (Bonnet and Begg, 1999). A dose do soro antidiftérico depende da severidade da doença e da difusão pelo hospedeiro. Para eliminação do patógeno, é administrado antibiótico, que pode ser eritromicina, azitromicina, claritromicina ou penicilina. A difteria nem sempre confere imunidade ao paciente que não recebeu a imunização completa. Prevenir infecções secundárias é considerada uma medida profilática. Após o tratamento com penicilina benzatina ou eritromicina os pacientes são testados novamente para garantir que o microrganismo não está mais presente.

1.3.4 Vacinação

A vacinação é a medida de controle mais importante da difteria. Ela normalmente é feita de forma sistemática, com aplicação de rotina pelos serviços de saúde, em forma de campanhas de vacinação, ou de bloqueio, realizada diante da ocorrência de um caso da doença. A vacina está presente em cinco diferentes formas: DT (dupla infantil), que consiste nos toxóides da difteria e do tétano juntos; dT, dupla adulto; DTP, acrescida de antígenos de célula inteira contra a coqueluche; DTPa, que possui, além dos toxóides, antígenos acelulares contra a coqueluche; e DTP + Hib, contra difteria, tétano, coqueluche e infecções graves causadas pelo *Haemophilus influenzae*.

A imunidade conferida pela vacina não é permanente e decresce com o tempo, daí a necessidade de reforço. A vacina dt é a vacina utilizada como reforço para adultos podendo ser administrada a partir dos sete anos completos.

O Ministério da Saúde preconiza a administração de três doses da vacina DTP + Hib, a partir de dois meses de vida, com intervalo de 60 dias entre as doses. Doses subsequentes da vacina DTP deverão ser aplicadas aos 15 meses (1º reforço) e aos quatro e seis anos de idade (2º reforço). A vacina dT deve ser administrada a partir de 7 anos completos. O esquema preconizado para os que não têm história de vacinação prévia contra a difteria (DTP, DTPa, DT, ou dT) é a administração de 3 doses, com intervalo de 2 meses entre elas (intervalo mínimo de 30 dias) e uma dose de reforço a cada 10 anos.

1.4 Novos aspectos da difteria: infecções causadas por linhagens não-toxigênicas e por *Corynebacterium ulcerans*

1.4.1 Linhagens atoxigênicas de *C. diphtheriae*

As linhagens atoxigênicas de *C. diphtheriae* também têm surgido como causa frequente de processos infecciosos que podem variar desde lesões cutâneas e faringites a doenças invasivas severas. Pacientes imunizados com o toxóide diftérico podem apresentar bacteremia e endocardite causadas por *C. diphtheriae* atoxigênica na ausência de lesões mediadas pela toxina (Mattos-Guaraldi et al., 2000).

Nakao e colaboradores (1996) analisaram o gene *tox* que codifica a DT em *C. diphtheriae* usando a técnica de SSCP (do inglês, *Single-Strand Conformation Polymorphism*), método capaz de detectar mudanças ao nível de nucleotídeo. Foi observada a heterogeneidade do gene nas linhagens causadoras das epidemias de difteria comparando com o gene *tox* da linhagem Park-Williams número 8 (PW8). Devido a essa heterogeneidade, a resposta imune obtida pela vacinação com o toxóide originado da PW8 pode não oferecer proteção adequada às pessoas que tiveram contato com essas linhagens (Nakao et al., 1996). A imunização reduz substancialmente o risco de desenvolver difteria, mas não previne infecções subclínicas por linhagens toxigênicas ou faringites e infecções invasivas causadas por linhagens atoxigênicas (Pallen et al., 1994).

1.4.2 Difteria causada por *Corynebacterium ulcerans*

A emergência da bactéria *C. ulcerans* vem sendo a maior causa de difteria nos países industrializados. Os países que mais reportaram casos de difteria causada pela *C. ulcerans* são Reino Unido, França e Alemanha (Wagner et al., 2010).

Introdução

Os pacientes podem apresentar lesões na pele, que parecem ser difteria cutânea, ou apresentar a típica pseudomembrana. Infecções por *C. ulcerans* também podem produzir síndromes no trato respiratório inferior, tal como pneumonia e sinais de inflamações sistêmicas. Ela pode ocorrer em pessoas imunizadas contra difteria (Hatanaka et al, 2003).

C. ulcerans pode induzir uma infecção severa, dependendo do estado imunológico do paciente. Embora a patogenicidade de *C. ulcerans* não dependa necessariamente da produção da DT, algumas linhagens desta bactéria produzem uma potente toxina e tem causado sintomas severos de difteria similares aos causados pela *C. diphtheriae* (Schuhegger et al., 2008). Recentemente, Sing e colaboradores (2003) descreveram as principais alterações moleculares na DT encontradas em duas diferentes linhagens de *C. ulcerans*, isoladas de dois pacientes na Alemanha. A sequência do gene *tox* das linhagens de *C. ulcerans* é diferente da sequência publicada para o gene *tox* de *C. diphtheriae* em 77 pb (~95% de similaridade), gerando 27 aminoácidos diferentes. Vinte e três destas diferenças de aminoácidos acontecem no fragmento B de ambas bactérias; sete delas situadas na região T e 16 na região do receptor. (Sing et al., 2003)

O contato pessoa-pessoa, não é reportado como método de transmissão, e, em alguns casos, a rota de transmissão não é clara. Porém recentemente, *C. ulcerans* toxigênicas foi isolada de gatos com escorrimento nasal, no Reino Unido (Hall, 2010).

Em 2008 foi reportado o primeiro caso de infecção por *C. ulcerans* no Brasil em uma paciente de 80 anos que veio a óbito, na cidade do Rio de Janeiro (Mattos-Guaraldi et al., 2008). Este grupo, também reportou recentemente o isolamento de uma linhagem de *C. ulcerans* da narina de um cachorro de canil em Niterói, região metropolitana do Rio de Janeiro (Dias et al., 2010).

1.5. Tipagem de linhagens de *Corynebacterium diphtheriae*

1.5.1 Tipagem de *Corynebacterium diphtheriae* baseada em perfis eletroforéticos

1.5.1.1 RAPD

Primeiramente usado por Williams e colaboradores e Welsh and McClelland (1990), análises de RAPD (do inglês, *random amplified polymorphic DNA*) envolvem amplificação do DNA genômico usando pequenos *primers* degenerados que se anelam aleatoriamente em partes do DNA, desta maneira é possível distinguir perfis de amplificação de diferentes linhagens de microrganismos. A técnica é simples e rápida, porém os resultados são comprometidos, uma vez que os *primers* não são específicos, o que pode dificultar a completa hibridização, podendo levar a um perfil errôneo das linhagens (Saulnier et al., 1993; Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990).

Em 1998, Nakao e colaboradores, aperfeiçoaram esta técnica para discriminar e correlacionar linhagens de *C. diphtheriae*. Neste estudo, foram identificados e biotipados 199 isolados. Destes, 185 eram *gravis* e 14 eram *mitis*. Os perfis do RAPD revelaram que, dos 14 isolados *mitis*, formaram três grupos distintos.

1.5.1.2 PFGE

A eletroforese em campo pulsátil ou PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) envolve a lise do microrganismo e digestão do DNA cromossômico

Introdução

com endonucleases (Tenovar et al., 1995). Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição são resolvidos em gel de agarose através do alternar periódico da direção da corrente elétrica para que estes grandes fragmentos de DNA possam ser efetivamente separados. PFGE é considerado uma excelente técnica de discriminação de linhagens, porém, esta técnica é limitada pelo tempo para se obter os resultados e pelo custo dos equipamentos (Ross et al., 2005).

Em 1995, Zoysa e colaboradores, realizaram um trabalho de epidemiologia molecular de *C. diphtheriae* em regiões da Rússia, utilizando esta técnica de PFGE. O perfil eletroforético revelou que, para os 75 isolados *gravis*, foram designados cinco grupos. Por outro lado, através de ribotipagem foram produzidos apenas quatro. Destes cinco grupos, o G1, abrigou 84% dos isolados, e estes eram provenientes de St. Petersburgo. Já os *mitis*, geraram dois diferentes grupos, porém 24 dos 25 isolados eram M1, que eram provenientes da região de Leningrad Oblast, mas que vinham de uma linhagem de St. Petersburgo (Zoysa et al., 1995).

1.5.1.3 AFLP

Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) é uma técnica baseada em amplificações por PCR de fragmentos de restrição gerados da digestão total do DNA genômico. Foi primeiramente descrito por Vos e colaboradores em 1995. Este método produz fragmentos de DNA utilizando primers genéricos que não requerem conhecimento prévio da sequência (Vos et al., 1995). O DNA é digerido e então são inseridos adaptadores para geração de sítios de ligação para a reação de PCR. Os fragmentos de restrição são amplificados por PCR utilizando conjuntos de *primers* que anelam nos adaptadores e sítios de restrição adjacentes. E então os fragmentos são visualizados em gel. Embora esta técnica tenha como benefícios a não exigência de conhecimento prévio das sequências, como ocorre com todas as

Introdução

ferramentas baseadas em padrão é limitado pela baixa reprodutibilidade e portabilidade.

Em 2000, foi realizado um estudo para avaliar a técnica de AFLP para tipagem de *C. diphtheriae*. Foi analisado um total de 57 isolados de nove ribotipos diferentes. Assim, foram atribuídos 10 perfis de AFLP, o que mostrou que a técnica é mais discriminante, porém, ela não foi capaz de discriminar o ribotipo predominante durante a epidemia na União Soviética (Zoysa e Efstratiou, 2000).

1.5.1.4 PCR-RFLP

Outra técnica bastante similar é o Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), ela é amplamente usada como ferramenta para tipagem de microrganismos de importância epidemiológica. Os resultados são complexos e analisados comparando-se perfis eletroforéticos. A ribotipagem reduz os fragmentos a serem identificados pois utiliza uma hibridização (*Southern blot*) dos fragmentos de DNA genômico digeridos com RNA ribossômico 16S e 23S, o que gera aproximadamente 20 a 25 bandas a serem analisadas (Hunter and Swaminathan, 1998). Comparações recentes entre técnicas de tipagem deste microrganismo constataram que a ribotipagem é a mais discriminante, e foi classificada como “padrão ouro” dos testes de detecção de *C. diphtheriae* (De Zoysa et al., 2008).

1.5.2 Análise Comparativa Entre os Diferentes Métodos de Tipagem Molecular

De Zoysa e colaboradores realizaram em 2008 um estudo comparativo destas quatro técnicas de tipagem molecular (ribotipagem, RAPD, AFLP e PFGE) para *C. diphtheriae*. Foram analisados 755 isolados de *C. diphtheriae* e os resultados mostraram que, através das técnicas de ribotipagem e RAPD, foram identificados 74 perfis eletroforéticos diferentes (de 13 a 27 fragmentos em RAPD); já o PFGE e o

Introdução

AFLP identificaram 72 perfis diferentes cada um. Assim, os autores mostraram que, o índice de diversidade encontrado com PFGE e AFLP foi menor do que o encontrado com a ribotipagem e o RAPD, indicando que são menos discriminatórios. Com isso, ribotipagem continua sendo o padrão ouro para tipagem de *C. diphtheriae*, e PFGE e AFLP não são amplamente utilizados por não serem bons discriminantes (De Zoysa et al., 2008).

Outro estudo comparativo, um pouco menor, foi feito por Sulakvelidze e colaboradores em 1999, e analisou 66 isolados provenientes da República de Georgia. Este foi o primeiro artigo de epidemiologia molecular feito para esta região após a epidemia dos anos 90. Eles observaram que a epidemia de Georgia estava, aparentemente, relacionada a um único grupo clonal de *C. diphtheriae*. As linhagens foram primeiramente tipadas pela técnica de RAPD. A biotipagem foi feita usando três diferentes técnicas: RAPD, PFGE e ribotipagem. Foi visto que PFGE e ribotipagem são superiores ao RAPD na discriminação de biotipos. Desta maneira, foi encontrado, com RAPD, apenas um perfil para os 62 isolados. Já o PFGE e a ribotipagem, encontraram cinco diferentes grupos mostrando que o RAPD é uma boa técnica para tipar linhagens. No entanto, para biotipagem, PFGE e ribotipagem são mais discriminativas (Sulakvelidze et al., 1999).

Análises de estruturas populacionais já foram feitas através de uma técnica chamada *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Ela detecta variações na sequência de aminoácidos de aproximadamente 20 enzimas metabólicas através da análise da mobilidade eletroforética das proteínas (Milkman, 1973; Selander et al., 1986). O perfil obtido determina um tipo eletroforético (*electrophoretic type* - ET).

A maioria das técnicas que usam análises de perfis eletroforéticos, tais como ribotipagem e PFGE, não conseguem inferir mecanismos evolutivos existentes entre

as linhagens. Como o MLEE tem como base genes *housekeeping*, que são conservados sob a pressão seletiva natural, é possível fazer esta inferência.

Recentemente, Bolt et al (2010) padronizou uma técnica *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) para identificar evidências de recombinação entre linhagens distintas desta bactéria.

1.5.3 Multilocus sequence typing

Proposto em 1998 por Maiden e colaboradores para *Neisseria meningitidis*, o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) é baseado na concepção genética proposta pelo MLEE como índice da variação nucleotídica no núcleo dos genes *housekeeping* (Maiden et al., 1998)

A maior discriminação feita pelo MLST é determinada pelo número e função dos genes analisados e o tamanho e regiões dos *loci* que foram selecionados na análise. O MLST é um procedimento usado para caracterizar isolados de espécies bacterianas usando sequências de fragmentos internos de genes *housekeeping* (sete normalmente). Aproximadamente 450 a 500 pb de fragmentos internos de cada gene é amplificado, e este pode ser usado para sequenciar as duas fitas com o auxílio de um sequenciador de DNA automático. Para cada gene *housekeeping*, diferentes sequências presentes em linhagens bacterianas diferentes, são classificados como alelos distintos. Para cada isolado, o conjunto dos alelos de cada um dos sete *loci* define o perfil alélico ou tipo de sequência, também chamado de *sequence type* (ST).

Cada isolado da espécie é posteriormente caracterizado pela série dos sete integrantes de alelos dos genes *housekeeping* escolhidos. No MLST, sequências

Introdução

diferentes são alelos diferentes, mesmo que difiram em um único nucleotídeo ou mais.

Em contraste com os métodos baseados em gel, que são dificultados pela baixa reprodutibilidade entre laboratórios, o perfil alélico pode ser obtido diretamente do material isolado pela amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos sete genes *housekeeping*, mesmo que os isolados não possam ser cultivados. E ainda, os dados gerados pelo MLST são facilmente compartilhados entre os laboratórios através de sítios na internet (<http://www.pubmlst.org> e <http://www.mlst.net>) que foram projetados para permitir que pesquisadores de todo o mundo comparem os perfis de seus isolados aos de outros contidos no banco de dados.

O esquema de MLST vem sendo desenvolvido para uma variedade de patógenos procariotos e eucariotos, e seus dados tem contribuindo para a epidemiologia e estudos da biologia destes patógenos. A vantagem desta técnica é que os fragmentos de genes podem ser amplificados diretamente da amostra biológica, evitando o cultivo do patógeno. Esquemas de MLST já foram elaborados para diversos organismos (Tabela 1.1), dentre eles estão *Streptococcus pneumoniae* e *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, e *Haemophilus influenza* (Maiden, 2006).

Estudos populacionais têm sido especialmente importantes para entender a biologia dos meningococcus e a doença causada. Estes estudos também influenciam nos estudos relacionados a populações genéticas mais generalizadas que visam explicar a propagação dos meningococcus invasivos (Maiden, 2006).

Análises de MLST de 107 isolados foram usadas para designar e validar o esquema de MLST de *Neisseria*, que confirmou que este organismo é não-clonal, resultado de várias taxas de recombinação e mutação de ponto (Maiden et al., 1998).

Outro estudo de isolados de uma coleção que representava uma população confirmou as observações anteriores e ainda permitiu estimar parâmetros mais

Introdução

precisos de recombinação e mutação. O esquema de MLST de meningococcus vem sendo estendido para incluir dois microrganismos próximos: *Neisseria lactamica* e *Neisseria gonorrhoeae* (Jolley et al., 2005).

Até hoje já foram depositados na *homepage* pubmlst.org, 57 esquemas de MLST de diferentes espécies de microrganismos, no qual, muitos destes são importantes patógenos humanos (<http://pubmlst.org>). A motivação para desenvolver a maioria destes esquemas foram as análises epidemiológicas ou investigação da estrutura das populações, ou ainda questões evolucionárias dos microrganismos (Maiden, 2006).

Os dados do MLST podem acomodar uma série de estruturas populacionais. Por exemplo, as análises de um grupo de *Bacillus cereus* mostraram que eles foram um grupo clonal e isto foi informativo para a relação com outras espécies de *Bacillus* como *B. anthracis* e *B. thuringiensis* (Maiden, 2006).

A história evolucionária de patógenos humanos vem sendo elucidada com dados de MLST. Um exemplo interessante é do patógeno ocasional *Vibrio vulnificus*, que em um estudo mostrou que o surto da doença causada por este microrganismo em Israel foi causada por um novo variante que, aparentemente, surgiu pela hibridização de dois variantes aquáticos extintos (Maiden, 2006).

TABELA 1.1 Organismos que já possuem banco de dados para armazenar o resultados gerados pela técnica de MLST.

Adaptado de Maiden, 2006

Organism	Website and link to database	Isolates	Sequence types
<i>Neisseria</i> spp.	http://pubmlst.org/neisseria/	7554	5440
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	http://spneumoniae.mlst.net/	3485	2138
<i>Campylobacter jejuni</i>	http://pubmlst.org/campylobacter/	3057	1683
<i>Staphylococcus aureus</i>	http://saureus.mlst.net/	1530	713
<i>Helicobacter pylori</i>	http://pubmlst.org/helicobacter/	413	401
<i>Candida albicans</i>	http://calbicans.mlst.net/	556	373
<i>Haemophilus influenzae</i>	http://haemophilus.mlst.net/	563	349
<i>Streptococcus pyogenes</i>	http://spyogenes.mlst.net/	855	324
<i>Enterococcus faecium</i>	http://efaecium.mlst.net/	603	313
<i>Streptococcus uberis</i>	http://pubmlst.org/suberis/	569	270
<i>Streptococcus agalactiae</i>	http://pubmlst.org/sagalactiae/	39	260
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	http://pubmlst.org/paeruginosa/	243	231
<i>Bacillus cereus</i>	http://pubmlst.org/bcereus/	276	180

Dentre os mais recentes esquemas de MLST realizados está o feito por Bolt em 2009. Foi o primeiro trabalho feito com *C. diphtheriae*. Neste estudo, Bolt analisou 150 isolados provenientes de 18 países. Os resultados mostram que o esquema de MLST foi aplicado com sucesso. As principais conclusões foram que o MLST foi capaz de identificar cepas associadas a um surto na antiga União Soviética (FSU) e uma possível epidemia no Haiti e na República Dominicana. Os resultados também foram, em geral, e acordo com o atual padrão ouro de tipagem para *C. diphtheriae*, a ribotipagem, exceto em dois momentos e, por último, uma nova sub-espécie foi identificada a partir de isolados obtidos a partir de dois gatos domésticos. Este estudo também examinou a diversidade genética no gene *tox* em *C. diphtheriae*, e viu que a

maior variação genética no gene *tox*, pôde ser encontrada se temporalmente e geograficamente mais diversos organismos são examinados.

1.5.4 Estudos epidemiológicos da difteria no mundo

A técnica considerada padrão ouro para tipagem de *C. diphtheriae* hoje é a ribotipagem. Ela é usada para identificar complexos clonais associados com o surto ocorrido na União Soviética. De Zoysa e colaboradores, biotiparam 100 isolados obtidos na Rússia em 1993, por ribotipagem e PFGE. Foram encontrados cinco padrões distintos com as linhagens do biotipo *gravis* (G1 a G5) e dois do biotipo *mitis* (M1 e M2). Oitenta e quatro por cento dos isolados *gravis* são do padrão G1, e 24 dos 25 *mitis* são do ribotipo M1. Seis isolados da Estônia e Finlândia, importados durante o surto na Rússia, foram ribotipos G1. Os ribotipos G1 e G2 diferem em três bandas, e os G4 e G1 em apenas uma. Com isso, os autores sugerem que as linhagens envolvidas no surto derivam de um grupo clonal (De Zoysa et al., 1995).

Estudos posteriores tiparam as linhagens envolvidas no surto pelas técnicas de PFGE e AFLP, mas não puderam distinguir os ribotipos G1, G2 e G4 (Nakao and Popovic, 1998; De Zoysa and Efstratiou, 1999; De Zoysa and Efstratiou, 2000).

Popovic e colaboradores examinaram a diversidade temporal e geográfica de 156 isolados obtidos da Rússia de 1985 a 1994 por ribotipagem e MLEE. O ribotipo predominante entre os *mitis* foi o M1. De 1990 a 1994, os ribotipos G1 e G4, aumentaram em 80% (Popovic et al., 1996).

Skogen e colaboradores tiparam 47 isolados obtidos no período de 1957 a 1987 por MLEE e ribotipagem. Este estudo mostrou que o complexo clonal G1-G4 existia há, pelo menos, cinco anos antes da epidemia (Skogen et al., 2002).

Em 2004, para facilitar a padronização da nomenclatura internacional de ribotipos, foi descrito por Grimont e colaboradores, um novo padrão baseado onde o isolado foi coletado pela primeira vez. O ribotipo G1, por exemplo, passou a ser chamado de Sankt-Peterburg, e o G4 de Rússia (Grimont et al., 2004).

Um estudo analisou a epidemiologia molecular de *C. diphtheriae* no período de 1996 a 2005. O período pós-epidêmico foi associado com uma mudança no padrão de predominância de ribotipos, por exemplo, enquanto a porcentagem de isolados Sankt Peterburg caiu de 24.3% (1996-2000) para 2.3% (2001-2005), a proporção de isolados Rússia aumentou de 25.1% para 49.1% (Kolodkina et al., 2006).

1.6 Epidemiologia Molecular de Linhagens Invasivas de *C. diphtheriae*

1.6.1 Linhagens invasivas

Linhagens de *C. diphtheriae* que são capazes de atingir órgãos internos, apresentando manifestações clínicas não típicas da doença são classificadas como linhagens invasivas. Os sintomas podem variar entre: faringite leve, infecções cutâneas, abscesso, septicemia e endocardite (Mattos-Guaraldi, 2004). Em descrições anteriores, estes casos de *C. diphtheriae* invasiva haviam sido associados a pessoas de baixo nível sócio-econômico; em sua maioria, usuários de drogas injetáveis, viciados em álcool e homossexuais; suportando a idéia de que a rota predominante da infecção e penetração na corrente sanguínea acontecia através de lesões na pele, como: ulcera cutânea, fraturas abertas, escabiose, entre outras (Patey et al., 1997; Gluber et al., 1998; Zasada et al., 2005; Ronmey et al., 2006). No entanto, endocardite diftérica já foi observada tanto em pacientes que não apresentavam fatores de risco quanto naqueles com cardiopatias pré-existentes, como prolapso da válvula mitral ou próteses valvulares (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998).

Introdução

O número crescente de casos de difteria causados por linhagens invasivas não-toxigênicas leva a uma associação de que, talvez, haja uma pressão seletiva exercida pela vacina que contém o toxóide diftérico, uma vez que ela protege somente contra linhagens toxigênicas. Esta pressão seletiva pode fazer com que a bactéria expresse ou desenvolva outros fatores de patogenicidade que ainda não são claros (Zasada et al.,2005). Portanto, *C. diphtheriae* não-toxigênica pode produzir uma doença atípica, onde o microrganismo é capaz de invadir tecidos e causar uma doença fulminante, aparentando ter uma predileção pelo endotélio cardíaco.

O primeiro caso de difteria invasiva foi descrito na literatura por Howard, em 1893, causado por uma linhagem não-toxigênica. Porém, a partir dos anos 90, houve um grande número de casos invasivos desta doença. De 1990 até 1995, 14 pacientes com infecções sistêmicas causadas por *C. diphtheriae* foram relatados, oito na Austrália, quatro na Suíça e um na França, Reino Unido e Cingapura (Patey et al., 1997). Além disso, em 1997 foram relatados mais 59 casos na França, onde 88% eram do BT *mitis*; havia três *gravis* e três *belfanti*, todas não-toxigênicas (Patey et al., 1997); em 1998 foram descritos 65 casos na Suíça (Gluber et al., 1998); em 2005 o primeiro caso de bacteremia causado por *C. diphtheriae* foi relatado na Polônia (Zasada et al., 2005) e em 2006 sete novos casos no Canadá (Romney et al., 2006).

1.6.2 Tipagem molecular de linhagens invasivas

Linhagens invasivas de *C. diphtheriae* vêm sendo relatadas em todo o mundo, dessa forma têm crescido o número de trabalhos relacionados à tipagem destes microrganismos. Em 1998, Gluber e colaboradores reportaram um surto de infecção causada por um único clone de *C. diphtheriae* não-toxigênica em usuários de drogas na Suíça. De 1990 a 1996, 65 pacientes com difteria foram reportados (Gluber et al., 1998).

Introdução

Outro estudo mais recente (2006), feito por Romney e colaboradores, relatou o último surto que aconteceu no Canadá, em Vancouver. Foram caracterizados sete isolados de pacientes hospitalizados; destes, seis eram *mitis* não-toxigêncios, o outro era *gravis* toxigênica. As análises de ribotipagem mostraram três diferentes grupos. Cinco das seis linhagens não-toxigênicas foram agrupadas, e este ribotipo nunca havia sido relatado na América do Norte (Romney et al., 2006).

Mesmo com estes estudos, ainda há escassez de informação nesta área. Estudos envolvendo a epidemiologia molecular destas linhagens, que vêm aumentando a cada ano o número de infecções reportadas, são necessários para o melhor entendimento da circulação destas linhagens no mundo.

1.6.3 Linhagens invasivas brasileiras

Na cidade do Rio de Janeiro foram isoladas linhagens invasivas de *C. diphtheriae* em diferentes períodos. Dois pacientes apresentando câncer estavam internados em uma mesma enfermaria do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Outras duas linhagens toxigênicas de *C. diphtheriae* BT *mitis* foram isoladas de casos de endocardite em diferentes períodos e em distintas unidades nosocomiais do Rio de Janeiro. Um dos casos descritos ocorreu em paciente adolescente que evoluiu para um quadro de endocardite mitral fatal, independente do tratamento com penicilina (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998). O outro caso foi em criança de nove anos de idade, com histórico completo de vacinação e não portadora de lesão cardíaca prévia, e que culminou na implantação de próteses valvulares aórtica e mitral.

Além dos sintomas característicos, estas linhagens apresentam outras características importantes, tais como: serem capazes de infectar pessoas não vacinadas e vacinadas, além de, na maioria dos casos, fermentarem sacarose (Mattos-Guaraldi e Formiga, 1998) e possuírem um perfil não-toxigênico.

Introdução

Em vários processos de identificação, a fermentação da sacarose é considerada como prova chave uma vez que, na maioria dos países, as amostras de *C. diphtheriae* apresentam-se incapazes de fermentar este carboidrato (Efstratiou et al., 1998). No entanto, a metabolização de sacarose foi observada em grande parte das amostras de países da América do Sul, como Venezuela e Brasil (Cardénas et al., 1972; Formiga e Mattos-Guaraldi, 1993).

Desde a década de 80, a prevalência das amostras fermentadoras de sacarose já era observada no Rio de Janeiro (Mattos-Guaraldi e Formiga, 1991; Formiga e Mattos-Guaraldi, 1993; Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998). Segundo Mattos-Guaraldi & Formiga (1991), as amostras isoladas do trato respiratório são predominantemente produtoras de ácido a partir da sacarose, enquanto a maioria das cepas provenientes de lesões cutâneas não é capaz de fermentar a sacarose.

Em um estudo recente, Hirata Jr e colaboradores (2008) fizeram uma tipagem molecular de quatro linhagens invasivas isoladas no Rio de Janeiro. Elas foram identificadas como sendo três do biotipo *mitis* e uma do biotipo *gravis*. Além disso, a técnica de RAPD foi usada para detectar pequenas diferenças entre as linhagens de *C. diphtheriae*. Uma significativa diversidade genética intra-espécie foi observada, o que os levou a inferir que elas pertencem a ribotipos diferentes. Porém, outros estudos já demonstraram que existe outra técnica que se aplica melhor a este tipo de análise, gerando dados mais confiáveis, específicos e criteriosos. Além disso, o número de linhagens estudadas (quatro) é muito baixo para que se possa fazer um estudo epidemiológico mais avançado, e ainda, poder inferir alguma relação genética entre as linhagens (Hirata Jr et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Corynebacterium diphtheriae é o agente causador da difteria humana, uma doença caracterizada pelos sintomas típicos como a formação de uma “pseudomembrana” branca, na garganta, que se torna cinza, podendo apresentar um aspecto necrótico e causar obstrução respiratória severa. O principal fator de virulência desta bactéria, que leva à manifestação mais séria da doença, é uma exotoxina conhecida como toxina diftérica (DT). A diminuição do número de casos de difteria ocorreu através de programas de vacinação em todo o mundo. Estas vacinas eram baseadas no toxóide diftérico, mas não conferiam imunidade permanente, havendo a necessidade de outras doses com o tempo. Hoje, a reincidência desta doença está altamente associada aos casos de infecção causada por *C. diphtheriae* não toxigênica. Estas linhagens são descritas por causarem, na maioria das vezes, doença invasiva, ou seja, a bactéria é capaz de atingir órgãos internos como miocárdio e pulmão, podendo levar a casos de septicemia

No Rio de Janeiro, foram isoladas seis linhagens toxigênicas de *C. diphtheriae* que se apresentavam na forma invasiva da doença. Além desta, outras características interessantes foram encontradas nessas linhagens, como a capacidade de infectar pessoas não vacinadas e vacinadas, além de, na maioria dos casos, fermentarem sacarose, característica essa incomum para esta espécie.

O fato de as linhagens invasivas serem tão diferentes do padrão, e estarem infectando um grande número de pessoas, incluindo pessoas vacinadas, é uma evidência da necessidade de estudos genéticos desta sub-população de *Corynebacterium diphtheriae*.

Os métodos de tipagem molecular desta bactéria descritos até hoje, tais como ribotipagem e PFGE, tem como prioridade, a análise de perfis eletroforeticos, o que pode levar a uma análise errônea dos resultados, além de não permitirem inferências

Justificativa

sobre os mecanismos evolutivos responsáveis pelas diferenças genéticas existentes entre as linhagens.

Recentemente, Bolt et al (2010) padronizou uma técnica *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) para identificar evidências de recombinação entre linhagens distintas desta bactéria. O MLST é uma técnica que possui grandes vantagens em comparação a outras técnicas de tipagem molecular de microrganismos. É rápida, facilmente aplicada, discriminatória e possui grande reprodutibilidade. Além disso, a técnica permite acomodar uma série de estruturas populacionais em um mesmo banco de dados, disponível online. A utilização desta nova metodologia para tipagem molecular de *C. diphtheriae* pode auxiliar no entendimento dos fatores genéticos que levam ao fenótipo invasivo de algumas linhagens desta bactéria.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise epidemiológica molecular de linhagens invasivas de *Corynebacterium diphtheriae*, utilizando a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Amplificar sete genes *housekeeping* das dez linhagens de *C. diphtheriae* alvo do estudo;
- ✓ Seqüenciar os sete genes *housekeeping* selecionados de cada linhagem;
- ✓ Depositar as seqüências obtidas no banco de dados para MLST de *C. diphtheriae* disponível *online*, bem como atribuir identificação alélica para estas seqüências;
- ✓ Atribuir *sequence types* (ST) para as linhagens invasivas de *C. diphtheriae*, de acordo com os perfis de alelos obtidos após os sequenciamentos.
- ✓ Avaliar o grau de recombinação entre os alelos dos diferentes STs de *C. diphtheriae* identificados.
- ✓ Avaliar possíveis relações clonais entre as linhagens estudadas e correlacionar os achados com as características microbiológicas e clínicas dos diferentes isolados..
- ✓ Escrever artigo científico reportando os achados epidemiológicos moleculares para a população de linhagens invasivas de *C. diphtheriae* isoladas no Brasil.

4. METODOLOGIA

4.1 Linhagens e condições de cultivo

As linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 4.1. Foram utilizadas 10 linhagens bacterianas no total. Dentre elas, duas são controles: ATCC27012, obtida da *American Type Culture Collection*, EUA e a CDC-E8392, cedida pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EUA. As outras oito linhagens são provenientes de isolados de diferentes pacientes e em diferentes períodos, na cidade do Rio de Janeiro, identificadas e estocadas no Laboratório de Difteria e Corinebacterioses da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

As linhagens HC01, HC02, HC03 e HC04, foram isoladas de amostras de sangue de pacientes com endocardite no período de 1993 a 2003, no Hospital das Clínicas do Rio de Janeiro. Já as linhagens 814 e 402, foram obtidas da biópsia do pulmão de pacientes neoplásicos. Linhagens obtidas da garganta com pseudomembrana de pacientes com difteria clássica (241 e VA01) também foram incluídas no estudo. Seis das oito linhagens brasileiras de *C. diphtheriae* apresentam o fenótipo sacarose positivo (Tabela 4.1)

Tabela 4.1 Relação das linhagens utilizadas no trabalho e suas características clínicas e microbiológicas.

Linagem	Local de isolamento	Biotipo	Fermentação da Sacarose	Ano	Perfil toxigênico
ATCC27012	Difteria respiratória	<i>Mitis</i>	-	D	ELEK+ / PCR+
DCD E8392	Difteria respiratória	<i>Mitis</i>	-	D	ELEK+ / PCR+
HC01	Endocardite (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998)	<i>Mitis</i>	+	1993	ELEK+ / PCR-
HC02	Endocardite	<i>Mitis</i>	+	1999	ELEK+ / PCR-
HC03	Endocardite	<i>Mitis</i>	+	2000	ELEK+ / PCR-
HC04	Endocardite	<i>Gravis</i>	-	2003	ELEK+ / PCR-
814	Pneumonia em paciente com câncer	<i>Mitis</i>	-	2000	ELEK+ / PCR-
402	Pneumonia em paciente com câncer	<i>Belfanti</i>	+	1998	ELEK+ / PCR-
TR241	Difteria típica	<i>Mitis</i>	+	1981	ELEK+ / PCR-
VA01	Difteria típica em paciente vacinado	<i>Gravis</i>	-	D	ELEK+ / PCR-

D = informação desconhecida

ELEK+/PCR- = Teste positivo pela técnica de ELEK e negativo pela técnica de PCR

As amostras foram estocadas em meio GC-glicerol 20% (Medium Base, Difco Lab., Detroit, USA) à temperatura de -20°C.

O meio utilizado para o cultivo bacteriano é o TSB (do inglês, *Tryptic Soy Broth*) (DIFCO); onde 3g de TSB e 0.25g de extrato de levedura são adicionados em 100 ml de água destilada. Este meio é acrescido de Agar bacteriológico na concentração final de 1,5% para cultura em meio sólido, e então o meio é autoclavado por 20 minutos a

Metodologia

120°C. Após autoclavação, sangue ovino é adicionado a 5%, para obtenção de TSB ágar chocolate. Este processo acontece da seguinte forma: após a autoclavação, o meio é colocado em banho-maria a 80°C até atingir esta temperatura, e então é acrescentado o sangue. Homogeneizar suavemente ainda em banho-maria por aproximadamente 15 minutos até atingir coloração marrom. Logo após, adicionar 2,8 mL de telurito de potássio (1%). O telurito deve ser autoclavado previamente. No caso do meio TSB Ágar Sangue, o procedimento é o mesmo, mas deve-se acrescentar o sangue quando o meio estiver à 37° C e não a 80° C, evitando-se, assim, a lise das hemácias.

A adição do telurito torna o meio seletivo para espécies do gênero *Corynebacterium*, visto que somente *Corynebacterium* e *Streptococcus* crescem na presença do mesmo. Além disso, ele confere uma cor preta característica às bactérias.

As culturas foram crescidas em caldo em aerobiose, à 37°C por 24 - 96 horas, ou mantidas em placas.

4.2 Biologia Molecular

4.2.1 Extração de DNA genômico das culturas bacterianas

O DNA genômico foi obtido da mesma forma para todas as linhagens bacterianas utilizadas neste estudo. A extração e purificação dos DNAs seguiram protocolos já descritos (Pacheco et al., 2007; Sambrook et al., 1989). Em resumo: 20 ml de cultura foram centrifugados a 5.000 rpm, por 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de solução I (Tris-HCl 10mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM e RNase A 50 µg/ml). Então a mistura foi *vortexada* e novamente centrifugada, a 13.000 rpm, durante 10 min., a temperatura ambiente. O

Metodologia

sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 1 ml da solução II (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM e Lisozima 10ng/ml). Após ressuspender o precipitado, a amostra foi incubada em banho-maria por 30 min. a 37°C. Foram adicionados 30 µl de sarcosil 30%; a amostra foi homogeneizada por 15 min. e então deixada em banho-maria por 5 min. a 65°C, seguido por incubação por 5 min. a 4°C. Para purificação do DNA extraído, 1 ml da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25 ml sol. saturada de fenol; 24 ml clorofórmio e 1 ml álcool isoamílico) foi adicionado à amostra. Após *vortexada*, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 min. A fase superior foi retirada e transferida para um microtubo novo. Repetiu-se o passo de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Ao final, a fase superior foi transferida para um microtubo novo para a precipitação do DNA. Acrescentou-se duas vezes o volume da amostra de etanol absoluto, 10% do volume de NaAC (3M) e 1% de glicogênio. O DNA foi precipitado *overnight* a -20°C. Então a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min., o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e o DNA, após seco, ressuspensionado em água mili-Q autoclavada.

4.2.2 Dosagem do DNA genômico extraído

A quantificação das amostras de DNA genômico foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro (BioPhotometer plus- Eppendorf), na absorvância de 260 nm, e para ver a qualidade das amostras, elas foram analisadas na absorvância de 280 nm, observando-se a relação da concentração 260/280.

4.2.3 Caracterização bioquímica dos isolados

Os microrganismos previamente cultivados foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos de metabolização de carboidratos glicose, maltose, sacarose e

glicogênio conforme descrito anteriormente (Clarridge e Sprigel, 1995; Formiga, 1986; Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998).

4.2.3.1 Sistema Comercial API Coryne

Os microrganismos foram submetidos ao sistema de identificação de corinebactérias API Corine (API Coryne System, BioMérieux Inc., La Balme les Grottes, France). O teste API Coryne é composto de 20 poços contendo substratos desidratados para a avaliação de atividades enzimáticas de catalase, pirazinamidase (PYZ), pirrolidonil arilamidase (PyrA), fosfatase alcalina (PAL), β - glucuronidase (β - GUR), β - galactosidase (β - GAL), α - glucosidase (α - GLU), β N-acetilglucosaminidase (β - NAG), redução de nitrato, hidrólise da esculina, uréia e gelatina, e capacidade de metabolização dos carboidratos glicose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose e glicogênio. Os inóculos foram preparados em água destilada estéril, em turvação correspondente ao tubo seis da escala nefelométrica de McFarland e semeados de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram interpretados pelo índice de perfil analítico definido para o sistema API após 24h/48 h de incubação a 37° C (Freney et al., 1991).

4.3 *Multilocus Sequence Typing*

4.3.1 Seleção dos genes *housekeeping*

Os genes usados na análise foram mantidos os mesmos do trabalho de Bolt (2009), que padronizou toda a técnica de MLST para *C. diphtheriae*. Foram evitadas regiões com alta pressão seletiva, tais como resistência a antibiótico ou genes codificadores de antígeno. Portanto, neste trabalho foram usados genes envolvidos em reparo de DNA, replicação e cadeia de biossíntese de aminoácido, e, os genes

Metodologia

que estariam perto de elementos gênicos móveis ou determinantes de virulência, foram eliminados.

Os genes *housekeeping* (Tabela 4.2) utilizados para desenho dos iniciadores de PCR e para os sequenciamentos (MLST), no trabalho de Bolt (2009) foram selecionados pela comparação dos genomas de *C. diphtheriae* (Cerdeno–Tarraga et al., 2003), *C. glutamicum* (Kalinowski et al., 2003) e *C. efficiens* (Nishio et al., 2003), usando os seguintes programas: Artemis e Double Artemis Comparison Tool.

Tabela 4.2. Características principais dos sete genes *housekeeping* selecionados para a análise de MLST

Gene	Descrição	Tamanho (pb)	Posição no genoma	Tamanho do fragmento (pb)
<i>atpA</i>	Cadeia alfa de síntese de ATP	1628	1030794 – 1032422	378
<i>dnaE</i>	Subunidade alfa da DNA polimerase III	3560	1606336 - 1609896	354
<i>dnaK</i>	Chaperona DnaK	1835	2170794 – 2172629	345
<i>fusA</i>	Fator G de elongação	2180	437925 – 440105	360
<i>leuA</i>	2-isopropilamato sintase	1818	228555 – 230373	384
<i>odhA</i>	2-oxoglutarato desidrogenase	3731	970254 – 973985	381
<i>rpoB</i>	Cadeia beta da RNA polimerase	3528	409723 – 413250	342

O programa Artemis, disponível para download em (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>) e Double Artemis Comparison Tool, disponível em: (http://193.129.245.227/pise/double_act.html) é um algoritmo desenvolvido para visualização de genomas e realização da anotação e curadoria manual, com distribuição gratuita. Tal algoritmo é escrito na linguagem Java e está disponível para os seguintes sistemas operacionais: UNIX, Macintosh e Windows. O Artemis é capaz de processar os seguintes arquivos: no formato .EMBL e .GENBANK, ou mesmo seqüência em formato .FASTA (Rutherford et al., 2000). Eles também fazem a comparação de genomas de diferentes organismos, permitindo a visualização

Metodologia

de regiões presentes em duas ou mais sequências, tornando possível a escolha de genes candidatos.

4.3.2 Iniciadores utilizados neste estudo

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados por Bolt, 2009. Eles haviam sido desenhados usando o programa Primer3, disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>, (Rozen et al., 2000). Os *primers* utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes de *C. diphtheriae* estão listados na Tabela 4.3.

TABELA 4.3. *Primers* usados para a PCR e sequenciamento dos sete genes *housekeeping* de *C. diphtheriae*

Gene	Foward ¹	Reverse ¹	Tamanho do amplicon (pb)	Foward ²	Reverse ²	Tamanho do amplicon (pb)
<i>atpA</i>	GCGATTGCGAACTAC ACC	CTCGAGGAATACCTR ACC	1029	AGGAGGCGACGAAG TMAAGC	CRGAATCAGAAGCTG GWGCA	378
<i>dnaE</i>	TGATTATGGCCAGCG TKC	ACCCATGGCYTTACG GAA	581	CGTGCCGYTRCKTGA RCATA	GGCTTWCGGCCATT YTTG	354
<i>dnaK</i>	ACTTGGGTGGCGGTA CTT	TGGTGAACGTCTCGG AAC	696	AGATGGCTATGCAGC GTCT	GATGAGCTTGGTCAT CACG	345
<i>fusA</i>	TACCGCGAGAAGCTC GTT	GAAGGTTGGGTCTC TTC	683	CGTAAGCTGACCGTT AACTC	CCATGGACTCRAGGA TGA	360
<i>leuA</i>	CGTGCACTTCTACAA CTC	ACCGTGATCGGTCTT CAT	865	CCYATCATCATCAAYC TGCC	CAGCTGGTTGCAGTA YTC	384
<i>odhA</i>	CGGCAAGGAAASCAT GAC	GTTGTCGCCRAACAT CTG	505	TBCAAGATCGCATYG ARRC	TWGGCTCGATGTGKC CTTC	381
<i>rpoB</i>	AAGCGAAGATCCA GGAC	TCGAACCTCGTCATCC	845	CGWATGAACATYGG BCAGGT	TCCATYTCRCCRAARC GCTG	342

¹ = Amplificações 5' – 3'

² = Amplificações 3' – 5'

4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amplificações do DNA por PCR para identificação das linhagens e posterior sequenciamento foram feitas para um volume final de 25 µl (Tabela 4.4) usando a *taq* DNA polimerase GoTaq (Promega, UK). Todas as reações foram feitas em duplicata nas mesmas condições, mostradas na Tabela 4.5. Sempre que possível, foram feitos

Metodologia

controles positivos, e o negativo foi feito substituindo-se a amostra de DNA por água estéril.

Tabela 4.4. Reagentes e quantidades utilizadas na reação de PCR para amplificação dos genes *housekeeping*.

Reagentes	Quantidade
Promega buffer (5X)	5 μ L
dNTPs (10mM)	0.5 μ L
Iniciador <i>foward</i> (10 μ M)	1 μ L
Iniciador <i>reverse</i> (10 μ M)	1 μ L
MgCl ₂ (25mM);	2 μ L
GoTaq	0.125 μ L
DNA	3 μ L
H ₂ O	q.s.p.25 μ L

Tabela 4.5. Condições da reação de PCR

Passo	Temperatura (°C)	Duração (min)	Quantidade de ciclos
Desnaturação	94	1	1
Desnaturação	94	1	35
Anelamento	58	1	
Elongação	72	2	
Extensão	72	5	

Para simplificar o protocolo do MLST, todas as reações são submetidas à mesma T_m e período de elongação.

Após a PCR, cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3.4 Reações de Sequenciamento

Para o sequenciamento, os produtos de amplificação por PCR com os iniciadores específicos foram precipitados utilizado o Kit “DYEnamic ET Dye Terminator” (GE Healthcare) em um sequenciador automático MegaBACE (GE Healthcare), segundo Sanger e colaboradores, 1977.

4.4 Análises bioinformáticas

4.4.1 Banco de dados MLST de *Corynebacterium diphtheriae*

Os dados gerados pelo sequenciamento das linhagens são depositados em um banco de dados de MLST para *C. diphtheriae* (Fig 4.2), disponível online no endereço www.pubmlst.org. Este é banco de dados de MLST para diversos organismos, ele foi criado por Keith Jolley em 2004 (Jolley et al., 2004), mas o MLST *C. diphtheriae*, foi incorporado a ele em 2009 por Frances Bolt (Bolt, 2009).

Ele permite aos pesquisadores atribuir perfis alélicos e ST's para os isolados estudados, diferentes dos já existentes no banco de dados. Também estão disponíveis informações de diversos isolados, além de programas que podem ser utilizados para as análises dos dados.

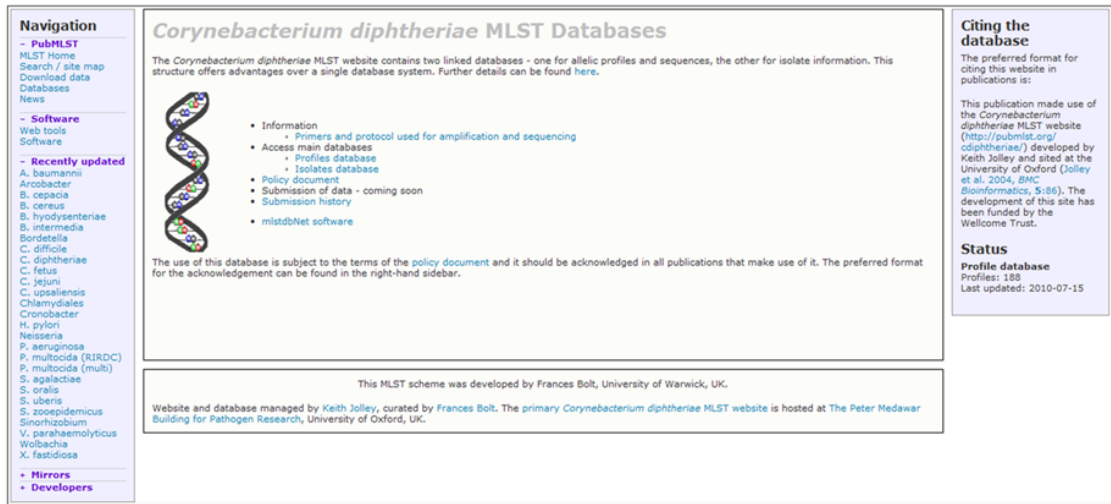


FIGURA 4.1 Imagem da *homepage* pubmlst para *C. diphtheriae*. Nele estão armazenados dados dos perfis alélicos já descritos por pesquisadores e informações sobre alguns isolados.

4.4.2 Designação dos alelos

O número dos alelos foi atribuído para cada sequência única do locus após depósito das sequências obtidas no banco de dados pubMLST (pubmlst.com). Os alelos sequenciados que já haviam sido numerados (sequências idênticas) receberam o mesmo número do primeiro. Uma nova ST foi determinada quando o perfil de todos os alelos ainda não havia sido encontrado (novo perfil). Para auxiliar nas análises, todos os alelos do esquema de MLST estavam em fase de leitura.

4.4.3 Ferramentas bioinformáticas utilizadas para as análises de MLST

Foi utilizada uma série de programas para a análise dos resultados obtidos pelo MLST para inferir um significado para estes resultados gerados, tais como examinar as relações genéticas entre os diferentes isolados, atribuindo uma relação de proximidade entre os mais semelhantes (eBURST e MEGA v4), ou ainda, analisar o equilíbrio de ligação dos alelos (LIAN v3.5), o que nos permite fazer inferências sobre a taxa de recombinação, além de estimar a diversidade genética dos alelos, inferindo uma relação evolucionária entre as linhagens. Estes programas encontram-se descritos abaixo.

4.4.4 Análise de eBURST

eBURST v3 é um algoritmo disponível online (<http://eburst.mlst.net>), projetado para uso em análises de dados de MLST de diversos organismos, incluindo bactérias patogênicas. Ele examina as relações entre genótipos e complexos clonais, entre diferentes complexos clonais, isto é, entre isolados mais distantes filogeneticamente. Esta relação pode ser justificada se a recombinação ocorreu com frequência ou durante um período de tempo longo, assim podem-se inferir sinais filogenéticos entre as linhagens. Uma parte fundamental da análise é a identificação do mais provável “ancestral” genotípico de cada complexo clonal, a partir do qual as variantes clonais têm sido descritas (Fiel et al., 2001).

Para as análises foram incluídos os perfis alélicos de todos os isolados e também foram utilizados os dados já depositados no banco online (<http://pubmlst.com>). Duas ST foram consideradas como provenientes do mesmo complexo clonal, quando apresentando pelo menos seis alelos idênticos entre si.

4.4.5 Cálculo do índice de associação

O índice de associação (I_a) foi calculado para cada população usando LIAN v3.5 disponível em www.pubmlst.org (Haubold and Hudson, 2000). Este programa testa todas as hipóteses de equilíbrio de ligação dos alelos estudados. O I_a foi determinado usando todos os dados e perfis alélicos para cada ST. Valores significativos foram determinados usando o método de Monte-Carlo com 1000 repetições. Quanto mais próximo de zero o valor de I_a , menos clonais são as ST; quanto maior este valor, mais semelhantes elas são.

4.4.6 Análise de decomposição dos *splits*

O programa SplitsTree v4, , disponível em www.splitstree.org, foi utilizado para estimar a diversidade genética dos alelos , inferindo uma relação evolucionária entre as linhagens (Huson e Bryant, 2006). Este programa identifica a aproximação das populações onde a recombinação está presente. O impacto de recombinação foi determinado usando as sequências de dados e alélica.

4.4.7 Análises Filogenéticas

A sequência nucleotídica dos alelos para cada isolado foi concatenada e utilizada para análises filogenéticas usando o programa Mega v4 (<http://www.megasoftware.net/>). A relação evolucionária foi inferida usando o método Neighbour-Joining com 1500 bootstraps. O algoritmo Jukes-cantor foi usado para calcular a distância evolucionária entre as linhagens. Esta distância foi baseada no número de substituições de pares de base entre o alinhamento das sequencias.

5. RESULTADOS

5. 1 Parte I – Artigo

Viguetti SZ, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R, Soares SC, Bolt F, Baldwin A, Dowson CG, Rosso M, Guiso N, Miyoshi A, Pacheco LGC, Azevedo V. (2010) **Multilocus Sequence Typing of Invasive *Corynebacterium diphtheriae* Strains Isolated in Brazil.**

Este manuscrito será submetido para publicação em um periódico científico internacional de referência na área de epidemiologia molecular.

RESEARCH NOTE

Multilocus Sequence Typing of Invasive *Corynebacterium diphtheriae* Strains Isolated in Brazil

S. Z. Viguetti¹, A.L. Mattos-Guaraldi^{2,*}, R. Hirata Jr.², S.C. Soares¹, F. Bolt³, A. Baldwin⁴, C.G. Dowson⁴, M. Rosso⁵, N. Guiso⁵, A. Miyoshi¹, L.G.C. Pacheco¹, and V. Azevedo^{1,*}

1) *Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*; 2) *Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*; 3) *Faculty of Medicine, Imperial College London, UK*; 4) *School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, UK*; and 5) *National Reference Centre for Toxigenic Corynebacteria, Institut Pasteur, Paris, France.*

Running title: MLST of invasive *C. diphtheriae* strains

*** Corresponding authors:** A.L. Mattos-Guaraldi. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 20551-030 Brazil. **E-mail:** aguaraldi@gmail.com. V. Azevedo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG, 31270-901 Brazil. **E-mail:** vasco@icb.ufmg.br.

Abstract

We have used multilocus sequence typing (MLST) to study genetic relationships between invasive strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Brazil; all the strains rendered negative results in PCR reactions for the *tox* gene, and some of them presented an atypical sucrose-fermenting ability. MLST results did not support the hypothesis that invasive (sucrose-positive) strains of *C. diphtheriae* are part of a single clonal complex. Nevertheless, comparative analyses with strains isolated in different countries provided further information on the geographical circulation of some sequence types.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, invasive strains, endocarditis, sucrose-fermenting, multilocus sequence typing.

Article Text

Diphtheria, the classical disease caused by *Corynebacterium diphtheriae*, is an acute communicable infection of the upper respiratory tract that can be fatal [1]. Though the global incidence of this disease has reduced dramatically as a result of increased vaccine coverage [2], infections by the different biotypes of *C. diphtheriae* continue to be reported in many countries [3] [4]. Besides, the emergence in the past years of nontoxigenic strains of this bacterium as causative agents of severe invasive infections in vaccinated and non-vaccinated individuals has raised major concern [5] [6] [4].

Most of the reports in the literature regarding invasive infections caused by *C. diphtheriae* are related to infective endocarditis [7]. Mortality rates are estimated to be high, and predisposing factors such as incompetent cardiac valves and intravenous drug use apparently contribute to the majority of the cases [7]. Nonetheless, endocarditis caused by *C. diphtheriae* has also been reported in individuals without recognized risk factors [5] [8].

Microbiological studies indicate that *C. diphtheriae* biotypes *gravis* and *mitis* are attributed to invasive diseases at similar rates, while infections by *intermedius* and *belfanti* biotypes are much less common [7]. Regardless of the biotype, the majority of the infections for which information is available were apparently caused by nontoxigenic strains of *C. diphtheriae* [5] [7]; molecular typing methods were used to identify specific clones of this bacterium as the causative agents of such invasive infections in only a few examples [9] [6].

In the present work, we sought to investigate the genetic relationships between invasive strains of *C. diphtheriae* isolated from clinical specimens referred to the Laboratory of Diphtheria and Non-diphtheria Corynebacterial Infections[†] in Rio de Janeiro - Brazil, during a ten year period (from 1993 to 2003).

Clinical and microbiological data on the *C. diphtheriae* invasive strains studied are shown in Table 1. All the strains (n = 6) rendered negative results in PCR reactions with previously published primers [REF] which target the *tox* gene (Table 1). Another striking characteristic of some of these *C. diphtheriae* isolates (n = 4) is an atypical sucrose-fermenting ability (Table 1) [10] [11]. The sucrose-positive phenotype has also been observed in a strain causing classical diphtheria in Brazil (strain TR241) [11]; therefore, this strain was included in the study along with a sucrose-negative strain (VA01) which also caused typical disease and was isolated in the same geographic region (Table 1). *C. diphtheriae* strains ATCC 27012 and CDC E8392 were used as controls.

We have used a recently introduced multilocus sequence typing (MLST) scheme [12] for molecular characterization of the *C. diphtheriae* strains. This method types strains by indexing nucleotide variation within seven housekeeping genes: *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* and *rpoB*. After amplification, the respective genes sequencing reactions were performed using a nested approach, according to the standardised protocol [12]. Allelic profiles and sequence type (ST) designations for each studied strain were obtained by depositing the generated DNA sequences in the PubMLST database (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>).

Of the six invasive *C. diphtheriae* strains studied 5 were new STs (Table 1). Only the sucrose-negative strain HC04, isolated from a case of endocarditis in 2003, generated a MLST profile that had been previously deposited in the database, ST-128. Interestingly, this was a single locus variant (SLV) of ST-80 at the *dnaK* locus; this ST was assigned in this study to a strain (VA01) previously recovered from a case of typical diphtheria that also displayed the sucrose-negative phenotype (Table 1), thereby indicating that the two isolates were clonally related (HC04 and VA01). Moreover, the fact that both strains were assigned to already known STs means that they are part of a clonal complex that comprises strains

Resultados

isolated in different countries including France (ST-128) and Canada (ST-80) (Figure 1). The *C. diphtheriae* control strains used in this study, both from North America, were also assigned to known MLST profiles (Table 1).

In order to further study the clonal relationships between invasive *C. diphtheriae* strains, we performed analyses using the eBURST V3 programme (<http://eburst.mlst.net/>). The analyses also included twelve previously identified STs [12], which were representative of different *C. diphtheriae* biotypes circulating during different years in The Americas, Europe, Africa and Asia (data not shown). Two STs were considered as being part of a clonal complex if they shared at least 6 of the 7 MLST alleles studied, as described [12].

eBURST analysis did not support the hypothesis that invasive *C. diphtheriae* strains isolated in Brazil form distinct clonal complexes. This result is different from what has been reported in other countries, where invasive infections caused by this bacterium were apparently related to specific clones causing disease outbreaks [9] [6]. In addition, the analysis also was not indicative of clonal relationships between all the sucrose-positive isolates of *C. diphtheriae*. This may be due to a high recombinogenic potential of the strains, as suggested by the index of association (I_A) between alleles at the different MLST loci, calculated as per [12]: I_A sucrose-positive strains = 0.0283; I_A all invasive strains = 0.1508.

Noticeably, ST-176 (strain HC02; *var mitis* isolated in 1999) formed a clonal complex with ST-27, which was previously assigned to a toxigenic *var. mitis* strain isolated in Argentina in 1995 causing classical diphtheria (Figure 1). This result may be indicative of a specific *C. diphtheriae var. mitis* clonal complex with circulation associated to South America, as has also been suggested in previous studies [3], though this still deserves further investigation. Most importantly, MLST results obtained for strains HC02 (ST-176) and HC04 (ST-128) demonstrate that *C. diphtheriae* strains causing invasive infections can be normally

Resultados

found in clonal complexes with strains related to non-invasive disease (Figure 1). Genetic and microbiological factors leading to the invasive phenotype are still poorly understood [6] [8].

Hirata Jr. and co-workers evaluated microbiological aspects that might be related to endocarditis caused by some of the *C. diphtheriae* strains used in the present study [8]. They have found a characteristic adherence phenotype of the invasive strains, which apparently correlated with specific protein profiles in SDS-PAGE gels; further studies are underway to evaluate the contribution of these factors in development of invasive infections [8]. In this same study, a preliminary analysis of genetic diversity of some Brazilian *C. diphtheriae* invasive strains was performed using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) [8]. Molecular typing by RAPD has been suggested recently to be as discriminatory as ribotyping, the current “gold standard” method, for analysis of *C. diphtheriae* [13]. Our MLST results were in concordance with the RAPD results by Hirata Jr. et al. [8], in which some of the invasive strains had already been proposed to be part of different clonal groups. Besides extending this analysis to novel strains, the intrinsic advantages of MLST over other molecular typing methods [14] allowed for a better understanding in the present study of the genetic relationships between invasive and non-invasive strains of *C. diphtheriae* isolated in Brazil.

Acknowledgements

This work was funded in part by CNPq, in Brazil, and the Medical Research Fund, in the United Kingdom.

Transparency Declaration

The authors have declared no conflict of interest.

References

- 1 Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 1: S116-20.
- 2 WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2009 global summary. Available at: http://www.who.int/immunization/documents/WHO_IVB_2009/en/index.html.
- 3 Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 987-993.
- 4 Wagner KS, White JM, Neal S, Crowcroft NS, Kuprevičienė N, Paberza R, Lucenko I, Jöks U, Akbaş E, Alexandrou-Athanassoulis H, Detcheva A, Vuopio J, von Hunolstein C, Murphy PG, Andrews N, Efstratiou A. Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007-2008: a multicentre European study. *Clin Microbiol Infect* 2010; : .
- 5 Reacher M, Ramsay M, White J, De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, Mackay A, George RC. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*: an emerging pathogen in England and Wales? *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 640-645.
- 6 Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1625-1629.
- 7 Mishra B, Dignan RJ, Hughes CF, Hendel N. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis--surgery for some but not all!. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2005; 13: 119-126.
- 8 Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 986-991.
- 9 Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1295-1298.

- 10** Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol* 1998; 37: 156-158.
- 11** Hirata Jr R, Pacheco LG, Soares SC, Santos LS, Moreira LO, Sabbadini PS, Santos CS, Miyoshi A, Azevedo VA, Mattos-Guaraldi AL. Similarity of rpoB gene sequences of sucrose-fermenting and non-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains. 2010; : .
- 12** Bolt, F, Cassiday, P, Tondella, ML, DeZoysa, A, Efstratiou, A, Sing, A, Zasada, A, Bernard, K, Rosso, M, Guiso, N, Baldwin, A, Dowson, C.. Multilocus sequence typing identifies evidence recombination and two distinct lineages within *Corynebacterium diphtheriae*.. 2010; : .
- 13** De Zoysa A, Hawkey P, Charlett A, Efstratiou A. Comparison of four molecular typing methods for characterization of *Corynebacterium diphtheriae* and determination of transcontinental spread of *C. diphtheriae* based on BstEII rRNA gene profiles. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3626-3635.
- 14** Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 561-588.

TABLE 1. Clinical and microbiological information about the strains of *Corynebacterium diphtheriae* used in this study and results of the MLST analyses.

Strains [Ref.]	Clinical information			Microbiological properties			MLST result	
	Patient Age/Sex/ Vaccinated	Disease	Year	Biotype	<i>tox</i> PCR ^a	Sucrose	Allelic Profile ^b	ST ^c
Invasive strains								
HC01 [8]	14 y.o./F/ Yes	Endocarditis	1993	<i>mitis</i>	-	+	2-1-37-19-24-3-4	<u>175</u>
HC02 [8]	9 y.o./F/ Yes	Endocarditis	1999	<i>mitis</i>	-	+	2-4-17-4-7-5-2	<u>176</u>
HC03 [8]	9 y.o./F/ Yes	Endocarditis	2000	<i>mitis</i>	-	+	2-2-36-19-3-3-6	<u>171</u>
HC04 [8]	7 y.o./F/ Yes	Endocarditis	2003	<i>gravis</i>	-	-	2-1-47-19-13-3-6	128
402	NK	Pneumonia	1998	<i>belfanti</i>	-	+	3-4-8-1-7-2-9	<u>173</u>
814	NK	Pneumonia	2000	<i>mitis</i>	-	-	3-2-2-4-3-32-6	<u>172</u>
Other strains								
TR241 [11]	NK	Respiratory diphtheria	1981	<i>mitis</i>	+	+	3-2-13-38-14-33-4	<u>174</u>
VA01	NK/NK/ Yes	Respiratory diphtheria	NK	<i>gravis</i>	+	-	2-1-32-19-13-3-6	80
Control strains								
ATCC 27012	NA	Respiratory diphtheria	NA	<i>mitis</i>	+	-	8-2-16-1-3-3-12	26
CDC E8392	NA	Respiratory diphtheria	NA	<i>mitis</i>	+	-	2-2-4-1-3-3-2	50

NK = not known; NA = not applicable (additional information available from the American Type Culture Collection, USA, or the Centers for Disease Control and Prevention, USA).

^a PCR reactions targeting the *tox* gene of *C. diphtheriae* were performed according to [REF].

^b Allelic order: *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* and *rpoB*.

^c Novel sequence types (ST) are underlined. Numbers in bold indicate matching with previously identified STs.

Figure 1

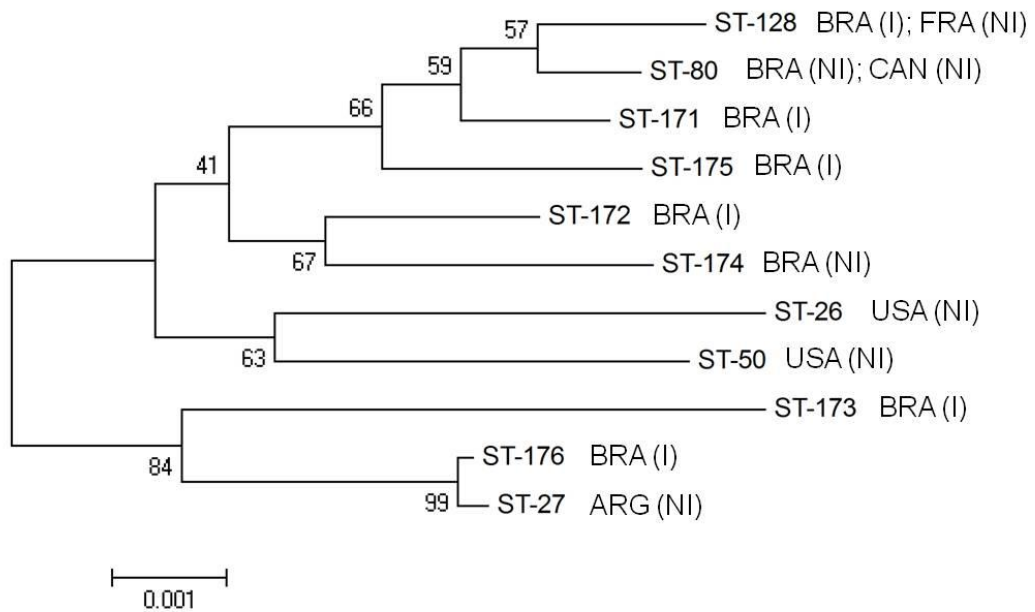


FIGURE 1. Neighbour-joining phylogenetic tree showing the genetic relationships between the STs of *C. diphtheriae* studied. Concatenated MLST sequences were used for this analysis. The countries of isolation of the different *C. diphtheriae* strains are indicated. I = isolate from invasive disease; NI = isolate from non-invasive disease (typical diphtheria).

5. 2 Parte II – Resultados adicionais

5.2.1 Amplificação dos genes *housekeeping* de *C. diphtheriae*

5.2.1.1. Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de PCR foram feitas para que o produto (amplificação de cada gene) pudesse ser sequenciado. Foram feitas reações de PCR para os sete genes de cada uma das linhagens estudadas, e, para confirmar a amplificação destes, os produtos foram resolvidos em gel de agarose 1% (Fig 5.1).

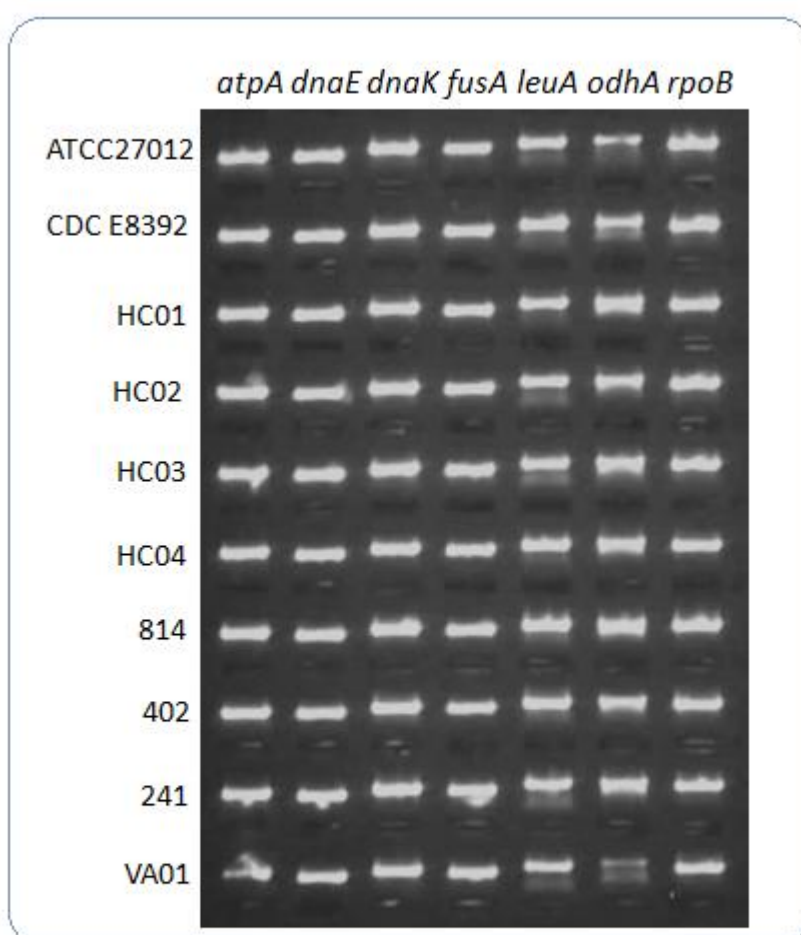


FIGURA 5.1 Amostras provenientes da PCR feita para confirmar a amplificação dos sete genes *housekeeping* das dez linhagens estudadas. Gel de agarose 1%, nas linhas horizontais estão os genes amplificados, nas linhas verticais as dez linhagens estudadas.

5.2.2 Novos alelos de *C. diphtheriae* encontrados

Os novos alelos (Tabela 5.1) gerados neste estudo foram depositados no banco de dados MLST para *C. diphtheriae*, conforme explicado no item 4.4.1. Através deste banco de dados foram geradas ST's para aqueles perfis alélicos que ainda não haviam sido depositados anteriormente.

TABELA 5.1. Relação dos alelos encontrados para cada um dos sete genes utilizados na análise de sequenciamento. Em destaque estão os alelos novos, gerados nesta análise.

<i>atpA</i>	<i>dnaE</i>	<i>dnaK</i>	<i>fusA</i>	<i>leuA</i>	<i>odhA</i>	<i>rpoB</i>
1, 3, 8	1, 3, 4	2, 4, 8, 13, 16, 17,27, 32, 36 47	1, 4, 19, 38	3, 7, 13, 14, 24	2, 3, 5, 32, 33	2, 4, 6, 9, 12

5.2.2.1 Novas ST's identificadas em linhagens invasivas

As análises de MLST geraram um resultado bruto a partir do sequenciamento dos sete genes selecionados para as linhagens. Estes dados foram depositados no banco de dados online (vide 4.4.1) e cada alelo de cada gene recebeu um número relativo aos alelos existentes nos bancos de dados. Os alelos que não possuíam seqüência depositada no banco de dados receberam um novo número. As ST's foram designadas para perfis alélicos, seguindo o mesmo padrão dos alelos, por exemplo, atribuindo ST's existentes nos bancos de dados a perfis alélicos idênticos aos já existentes e novas ST's a perfis alélicos não depositados previamente. Para definir um perfil alélico como sendo uma nova ST, foram consideradas mudanças de apenas um alelo. (Tabela 5.2).

Foram obtidas seis novas ST's para as 10 linhagens de *C. diphtheriae* usadas na análise (Tabela 5.2). Das seis linhagens invasivas, cinco receberam novos perfis alélicos e conseqüentemente, novas ST's. A única linhagem que não recebeu uma nova ST foi a HC04, BT *gravis*.

5.2.3 Alto potencial recombinogênico das linhagens

O grau de recombinação entre as linhagens bacterianas estudadas foi avaliado usando o Índice de Associação (*I_a*), o qual mensura os níveis de conexão entre os alelos dos diferentes *loci* (Fig 5.2). Análises de recombinação foram feitas para todas as linhagens usadas neste estudo. Primeiramente foi obtido o *I_a* para as linhagens *mitis* e *belfanti* (0.0269) e depois *mitis*, *belfanti* e *gravis* (0.2407). Para avaliar se as linhagens *sac*⁺ seriam mais recombinogênicas, o *I_a* também foi mensurado (0.0283), assim como o das linhagens invasivas (0.1508).

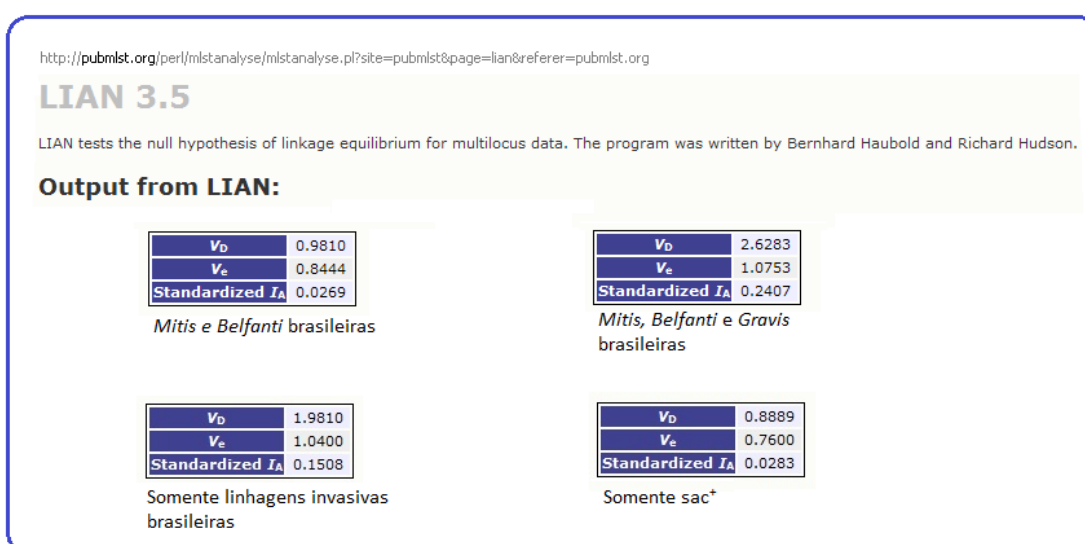


FIGURA 5.2 Imagem do *I_a* obtido em cada uma das análises feitas no programa LIAN 3.5.

5.2.4 Linhagem I de *C. diphtheriae*

Bolt e colaboradores identificaram em suas análises duas linhagens na coleção de *C. diphtheriae*. A linhagem I contém uma grande proporção de isolados, e, todos são dos biotipos *mitis*, *gravis* e *intermedius*. Cinco linhagens *belfanti* foram classificadas como pertencentes à Linhagem I (Fig 5.3), porém estas são toxigênicas (DT⁺), o que é atípico para este biotipo (ST 26). Já a Linhagem II é composta exclusivamente pelo biotipo *belfanti* (11). Todas foram representadas por STs diferentes (11 STs), e são fenotipicamente típicas (DT⁻) (Bolt et al., 2010). O programa *Splits decomposition* gerou uma árvore de acordo com estes dados. As linhagens brasileiras estão na Linhagem I, que possui representantes de todos os BT.

TABELA 5.2. Resultado bruto obtido a partir do perfil alélico de cada linhagem. As ST's em amarelo, representam novas ST's geradas pelo banco de dados.

Linhagem	Biotipo	Nº ST	Sequencia obtidas para os alelos							
			seq atpA	seq dnaE	seq dnaK	seq fusA	seq leuA	seq odhA	seq rpoB	
ATCC 27012	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	26	8	2	16	1	3	3	12
CDC E8392	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	50	2	2	4	1	3	3	2
814	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	172	3	2	2	4	3	32	6
VA01	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	gravis	80	2	1	32	19	13	3	6
402	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	belfanti	173	3	4	8	1	7	2	9
241	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	174	3	2	13	38	14	33	4
HC01	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	175	2	1	37	19	24	3	4
HC02	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	176	2	4	17	4	7	5	2
HC03	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	mitis	171	2	2	36	19	3	3	6
HC04	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	gravis	128	2	1	47	19	13	3	6

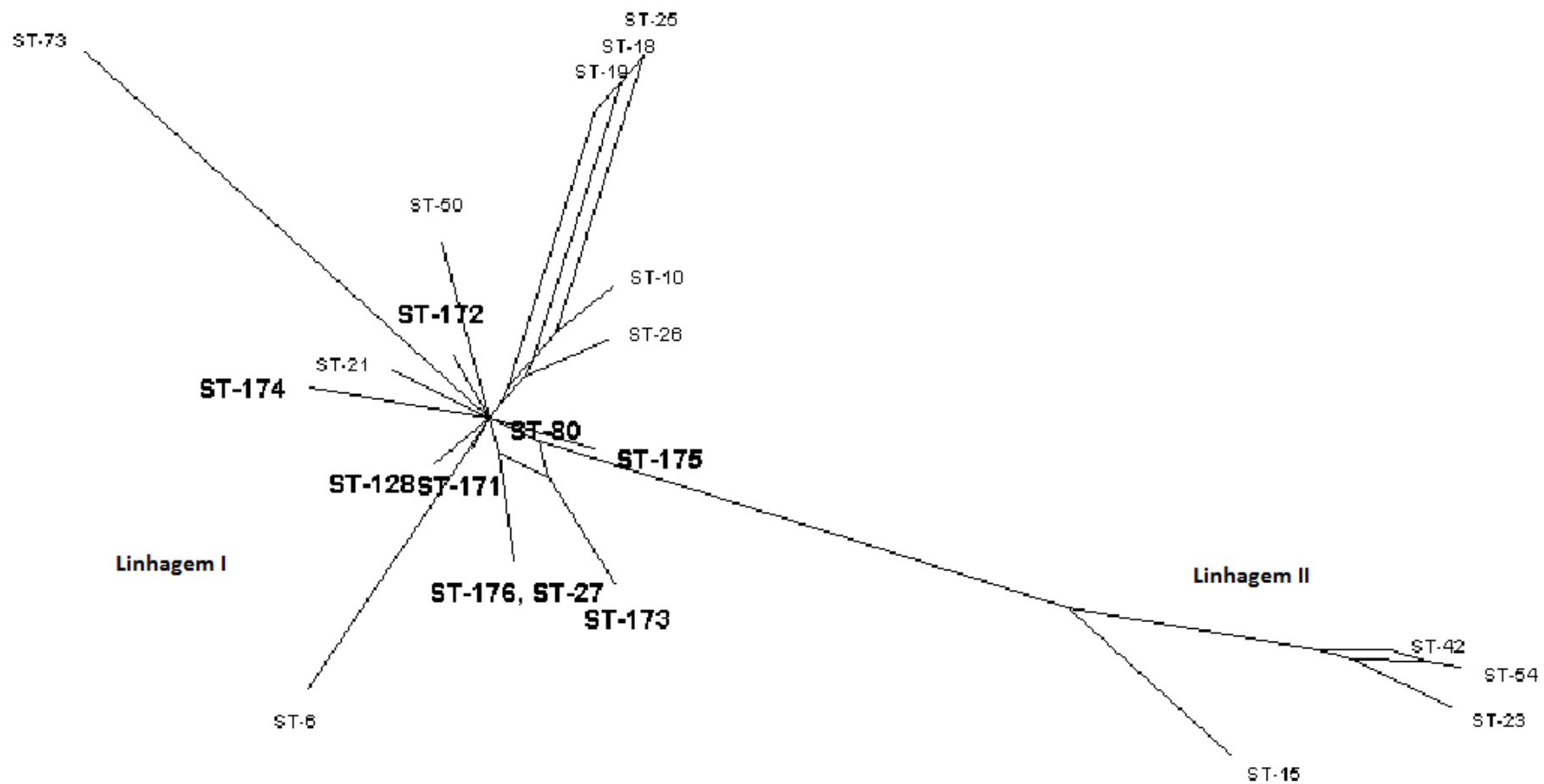


FIGURA 5.3 Árvore de decomposição gerada pelo programa *Splits Decomposition*. Nota-se que as linhagens brasileiras estão todas agrupadas na Linhagem I, e a Linhagem II possui apenas representantes do BT *belfanti*.

5.2.5 Análises de agrupamentos clonais

Com o objetivo de estudar possíveis agrupamentos clonais das linhagens, foi utilizado o programa eBURST. Este programa compara os alelos de cada ST, independente das linhagens. Quanto maior o número de alelos iguais, maiores as chances das ST's agruparem-se. Este agrupamento determina quais ST's possuem linhagens filogeneticamente próximas, provenientes de um mesmo grupo clonal. A figura 5.6 mostra as ST's que se agrupam tendo somente um alelo diferente e as que permanecem isoladas como *singletons*.

Os resultados obtidos com o sequenciamento dos sete genes *housekeeping* de cada linhagem estudada (ST's e alelos) foram usados para gerar uma figura de eBURST. Todas as ST's obtidas neste trabalho foram confrontadas com todas as ST's já presentes no banco de dados. Para melhor entendimento dos resultados, foi gerada uma figura onde foram analisadas somente as ST's que, de alguma forma, estão relacionadas com os resultados obtidos (Fig 5.4).

Resultados

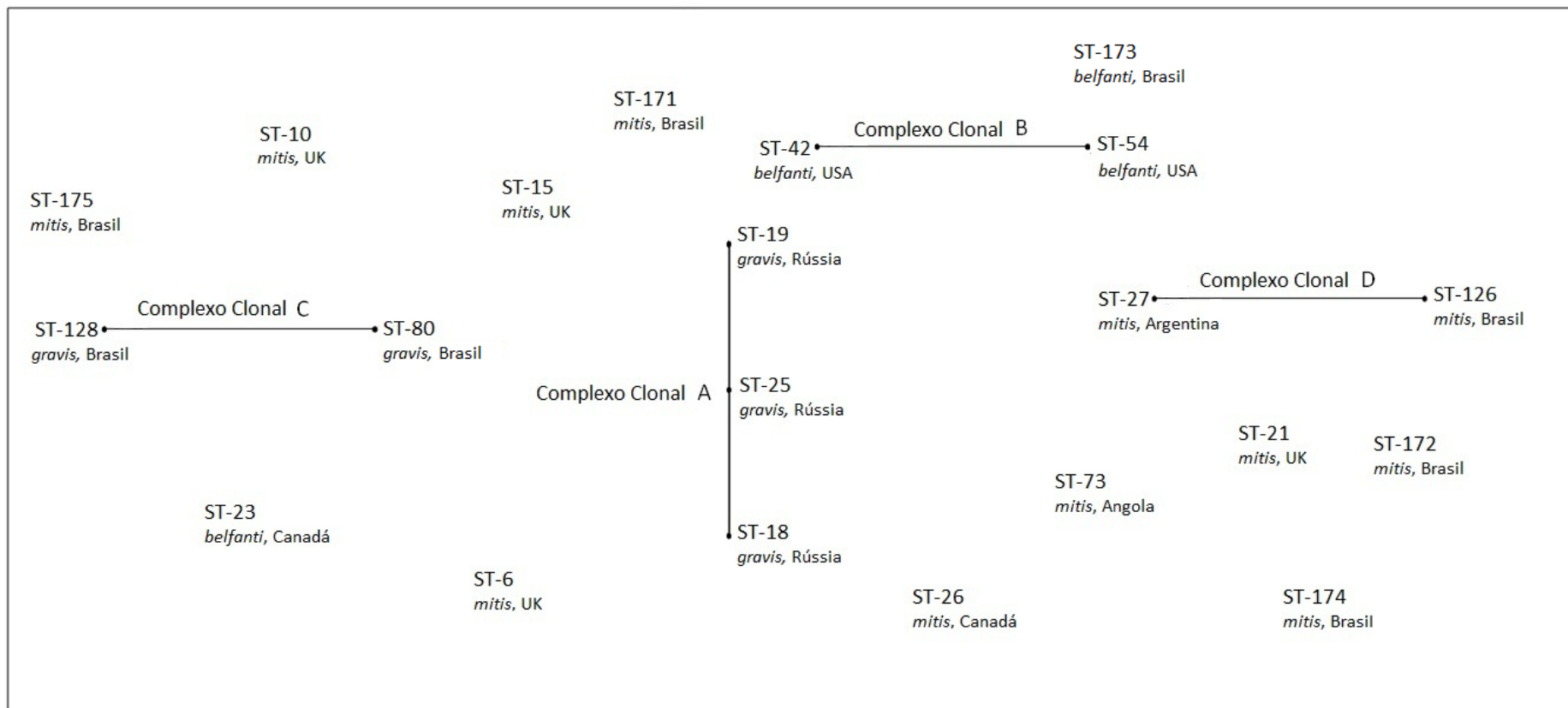


FIGURA 5.4 Imagem gerada pelo programa eBURST (mod). Nota-se a formação de quatro complexos clonais (A, B, C e D)

Esta análise mostra a formação de quatro complexos clonais. Foi considerado um grupo clonal quando seis dos sete alelos do MLST eram idênticos.

O complexo clonal 'A' é formado por ST's provenientes do banco de dados, e serviu como um controle positivo do trabalho, demonstrando que é possível a formação de complexos entre diferentes ST's e, ainda, que é possível a junção, em uma única ST, de linhagens do mesmo BT provenientes de diferentes regiões (USA, Rússia e Cazaquistão) e isoladas em diferentes períodos (Tabela 4.1). Outro controle utilizado neste trabalho foi o complexo 'B', formado apenas por representantes do BT *belfanti*, a fim de provar a possibilidade de ocorrência de grupos clonais somente de isolados deste biotipo.

A linhagem invasiva HC04 (*gravis*), do BT *gravis*, apresenta a mesma ST de linhagens não invasivas isoladas da França, e ainda forma um complexo clonal (C) com linhagens originárias do Canadá, onde está presente a linhagem VA01 (*gravis*, não invasiva), mostrando que estas podem ter uma origem comum.

Interessantemente, uma linhagem invasiva brasileira (HC02), BT *mitis*, formou um complexo clonal (D) com uma linhagem não invasiva isolada de um caso de difteria comum na Argentina (1995).

5.2.6 Análises Filogenéticas

A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA V4 (Fig 5.5), utilizando o método Neighbour-Joining com 1500 bootstraps, a partir da sequência concatenada dos alelos. Alguns dados corroboraram com os dados obtidos pelo programa eBURST, outros indicam a proximidade genética de isolados que não apareceram juntas no resultado gerado pelo eBURST.

As ST's 128 (HC04, invasiva, sac⁻) e 80 (VA01, não invasiva, sac⁻) estão em um mesmo clado, uma vez que são uma variante de um único locus (SLV). Neste mesmo clado

Resultados

está a ST 171 que é proveniente de outro na qual está a ST 175 (HC01, invasiva, sac⁺). A ST 176 (HC02, invasiva, sac⁺) ficou agrupada no mesmo clado da ST 27, não invasiva e proveniente da Argentina, as quais formaram um complexo clonal (D) no eBURST. Dando origem a este último está a ST 173 (402, invasiva, sac⁺). Também encontramos outro clado formado pelas ST's 172 (814, invasiva, sac⁻) e 174 (TR241, não invasiva, sac⁺).

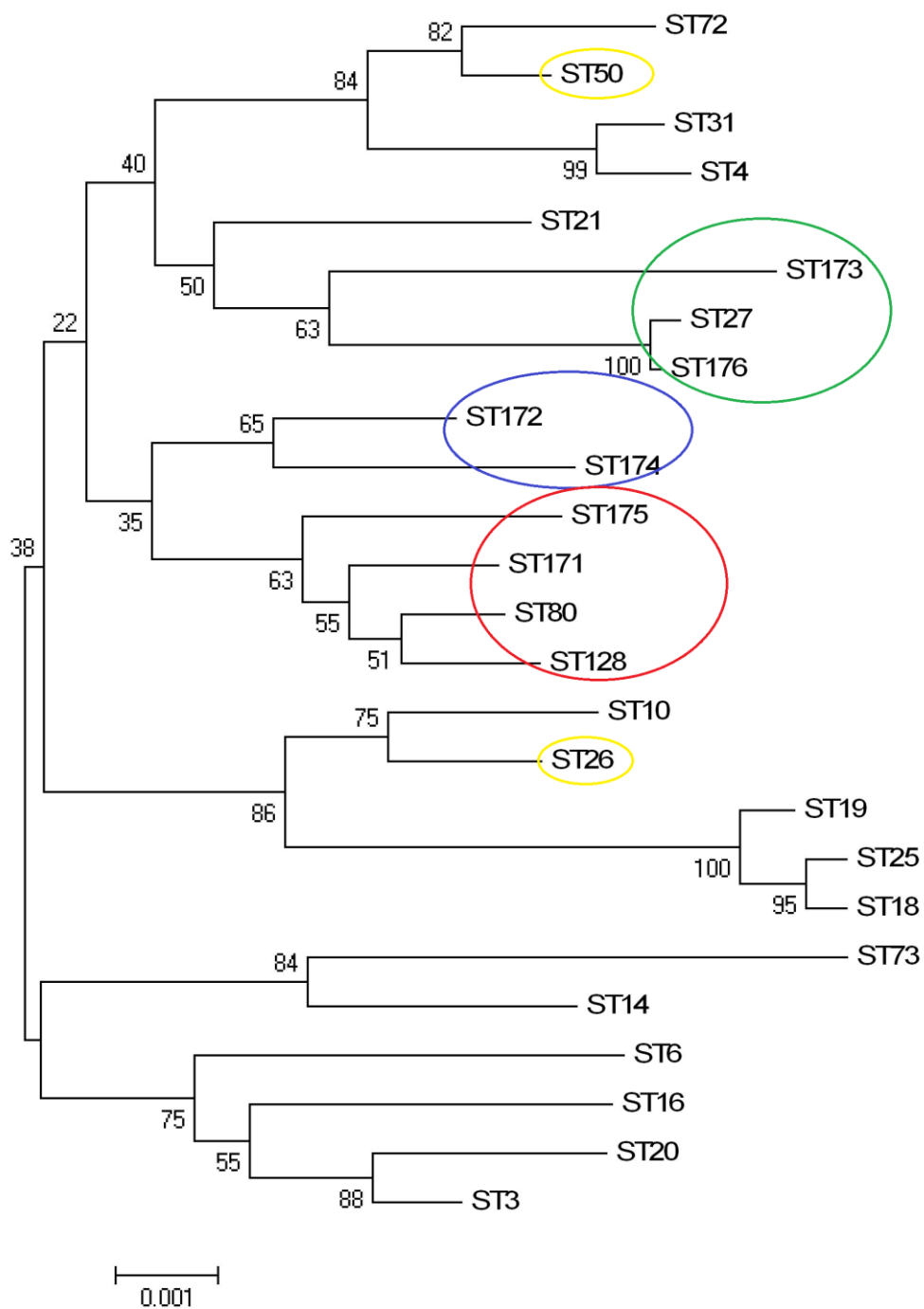


FIGURA 5.5 Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA v4. As linhagens controle estão representadas em amarelo. Demais marcações representam as proximidades genéticas existentes entre os outros isolados brasileiros.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada uma análise epidemiológica molecular de *Corynebacterium diphtheriae* utilizando um esquema de MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*) recém desenvolvido por Bolt e colaboradores (2010). Foi analisado um total de 10 linhagens desta bactéria. Destas, oito foram isoladas no Brasil, sendo que seis são invasivas e cinco apresentam outra característica incomum à espécie *C. diphtheriae*: fermentam sacarose. Esta característica vem sendo descrita em linhagens brasileiras desde 1993 (Formiga e Mattos-Guaraldi, 1993).

Após o sequenciamento dos sete genes *housekeeping* das 10 linhagens estudadas, as sequências obtidas foram depositadas num banco de dados *online* para esquemas de MLST de *C. diphtheriae* (vide item 4.4.1) (Bolt et al., 2010). Das seis linhagens invasivas testadas, cinco representam novos ST's (do inglês, *sequence types*): 171, 172, 173, 175, 176. O resultado obtido aqui foi diferente dos encontrados nos poucos estudos epidemiológicos existentes com linhagens invasivas de *C. diphtheriae*, onde os diferentes isolados invasivos tenderam a se agrupar em um mesmo complexo clonal (Patey et al., 1997; Gluber et al., 1998; Zasada et al., 2005; Ronmey et al., 2006). Porém, nossos resultados corroboram com o encontrado por Hirata Jr e colaboradores que afirmaram, por análises feitas com a técnica de RAPD, que algumas linhagens invasivas isoladas no Rio de Janeiro não formam um complexo clonal (Hirata Jr et al., 2008). Além destas, outra ST nova encontrada neste trabalho foi a 174, gerada por uma linhagem não invasiva (TR 241).

Os resultados obtidos com o programa eBURST V3, mostram a formação de um complexo clonal entre as linhagens brasileiras HC04 e VA01, sendo que cada uma delas está agrupada em diferentes ST's (128 e 80, respectivamente), segundo o banco de dados pubMLST. Cada uma destas ST's possui representantes isolados de diversos países, entre eles França e Canadá. Portanto, o fato de a linhagem HC04 ser invasiva, não excluiu a possibilidade de ser agrupada com linhagens causadoras de difteria clássica, sugerindo que estas linhagens possam ter um ancestral comum.

Outra análise importante a ser comentada é o fato de a linhagem invasiva HC02 formar um complexo clonal com uma linhagem (ST27) isolada de um caso prévio de difteria clássica na Argentina, mostrando que aparentemente há um grupo clonal de linhagens do BT *mitis* com circulação associada à América do Sul, hipótese essa que já havia sido levantada em outro trabalho (Formiga e Mattos-Guaraldi, 1993).

As análises de MLST deste estudo sugeriram também que, aparentemente, não há associação genética entre as linhagens sacarose positivas, o que nos leva a acreditar que estas não são necessariamente provenientes de um mesmo grupo clonal. Portanto, a propriedade de fermentar sacarose pode ter sido adquirida em momentos diferentes, através de eventos de transferência genética horizontal, mas isto permanece a ser esclarecido.

O potencial recombinogênico encontrado para as linhagens indica que o BT *gravis* é menos recombinogênico que os *mitis* e *belfanti*, uma vez que, quando calculado o índice de associação (*I_a*) das linhagens separadas por BT (*mitis*; *mitis* e *belfanti*; *mitis*, *belfanti* e *gravis*), sempre que o *gravis* é incluído, o valor é aumentado. Ainda não há um número suficiente de linhagens *gravis* para que seja feito um cálculo específico para este BT. No entanto, Bolt e colaboradores em 2010 fizeram este cálculo para um total de 17 linhagens *belfanti*, e também viram um alto potencial recombinogênico das linhagens. Ainda é suportada a idéia de que as linhagens invasivas não seriam mais recombinogênicas, uma vez que seu *I_a* foi elevado quando comparado aos de não-invasivas. Já o das linhagens *sac*⁺ foi bem baixo (0.0283), indicando que estas são bastante recombinogênicas. Como o número amostral é baixo, há a necessidade de uma nova análise com mais isolados para que esta hipótese se confirme.

A análise com o programa *Splits Decomposition* gerou uma árvore que vai de acordo com o previamente proposto (Bolt et al., 2010), onde na Linhagem I estão

agrupados preferencialmente os BT *mitis*, *intermedius*, *gravis* e somente alguns *belfanti*, e na Linhagem II, somente o BT *belfanti*. As únicas *belfanti* presentes na Linhagem I foram seis linhagens provenientes do Canadá. Elas são consideradas como atípicas, uma vez que são tox⁺. As linhagens *belfanti* são caracterizadas por ser não-toxigênicas e produzirem uma infecção mais branda (Efstratiou et al., 2000). Dessa forma, todas as linhagens brasileiras estão agrupadas na Linhagem I. O que pode ter levado a linhagem *belfanti* 402 estar agrupada na Linhagem I, e não na exclusiva de *belfanti*, é o fato de ela também ser atípica (ELEK-positiva), assim como as linhagens canadenses do estudo de Bolt.

Também fomos capazes de mostrar que a técnica de MLST não pode ser aplicada para separação das linhagens quanto ao BT, uma vez que a linhagem ATCC27012 é *mitis* e se agrupou em uma ST (26) com representantes *belfanti*; corroborando resultados já descritos na literatura (Bolt et al., 2010).

A árvore filogenética gerada pelo programa MEGA v4 (Fig 4.7) mostrou que, como analisado pelo programa eBURST, as ST's 128 e 80, ambas *gravis*, estão em um mesmo clado, pois são muito próximas geneticamente (são uma SLV segundo o eBURST). Este clado está muito próximo de outros dois nos quais estão as ST' 171 e 175, ambas *mitis* invasivas, mostrando que há variação genética significativa entre linhagens invasivas e não-invasivas para separá-las em diferentes grupos clonais, mas não para separá-las completamente na árvore filogenética. Isto também foi observado em outros dois cladros. No primeiro, estão as ST's 176 e 27, onde a ST176 é uma linhagem invasiva *mitis* e a ST27 é não invasiva proveniente da Argentina, o que é interessante, pois apesar de serem isoladas em períodos e países diferentes (Tabela 4.1), existe uma grande proximidade genética, nos levando a acreditar que há uma aparente circulação de linhagens *mitis* associada à América do Sul. O outro clado que agrupou linhagens invasivas e não-invasivas é onde estão localizadas as ST's 172 e 174 (Fig 5.7).

Discussão

Também não foi observada ligação entre as linhagens sac⁺ (ST's 171, 174, 175, 176), uma vez que estas foram agrupadas em clados com linhagens sac⁻ (ST's 172, 175, 80, 128), indicando que esta característica, aparentemente, não foi adquirida da mesma forma ou ao mesmo tempo por todas as linhagens, o que nos leva a acreditar que os genes responsáveis pela fermentação de sacarose são parte do genoma acessório da espécie *C. diphtheriae*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Conclusões

Nas condições do presente estudo, é possível concluir que:

- ✓ MLST se mostrou uma excelente ferramenta para análise epidemiológica molecular de isolados de *C. diphtheriae*. A técnica é reprodutível e de fácil implementação.
- ✓ A análise de MLST sugeriu que linhagens invasivas brasileiras de *C. diphtheriae* não são parte de um complexo clonal epidêmico.
- ✓ Foram identificados complexos clonais que reúnem tanto linhagens invasivas de *C. diphtheriae* quanto linhagens isoladas de casos típicos de difteria.
- ✓ Foi identificado um complexo clonal de linhagens do biotipo *mitis* com circulação aparentemente associada à América do Sul, como sugerido em trabalhos prévios.
- ✓ Linhagens do biotipo *mitis* apresentaram maior diversidade genética provavelmente devido ao elevado potencial recombinogênico dos clones.
- ✓ Linhagens do biotipo *gravis* apresentaram potencial recombinogênico mais baixo e isolados de diferentes países foram detectados num mesmo complexo clonal.
- ✓ A linhagem controle de *C. diphtheriae* ATCC27012 é do biotipo *mitis* e apresentou perfil de MLST da ST – 26, que possui representantes do biotipo *belfanti*, mostrando que este tipo de análise pode não ser eficaz na classificação quanto ao biotipo.
- ✓ Todas as linhagens invasivas brasileiras de *C. diphtheriae* se agrupam na Linhagem I da espécie.

7.2 Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho nos abrem perspectivas interessantes a cerca da epidemiologia molecular desta bactéria bem como de outras espécies filogeneticamente próximas:

- ✓ Estender a análise de MSLT para novas linhagens invasivas de *Corynebacterium diphtheriae*, isoladas em diferentes países, a fim de compreender melhor as relações genéticas entre linhagens que apresentam o fenótipo invasivo.

- ✓ Confirmar através de outros estudos o alto potencial recombinogênico das linhagens de *C. diphtheriae*.

- ✓ Avaliar a circulação de linhagens de *C. diphtheriae* que apresentam o fenótipo sacarose positivo em países da América do Sul, a fim de confirmar a associação geográfica destas linhagens.

- ✓ Implementar um novo sistema de MLST para análises epidemiológicas moleculares de outra espécie bacteriana de grande importância veterinária, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blewitt MG, Chung LA, London E. (1985) **Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration.** *Biochemistry.* 24, 5458-64

Bolt F. **The population structure of the *Corynebacterium diphtheriae* group.** Tese submetida ao Departamento de Biologia como requisito para obtenção do título de Doutor. University of Warwick, fevereiro, 2009.

Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, Zasada A, Bernard K, Rosso ML, Guiso N, Baldwin A, Dowson C. (2010) **Multilocus sequence typing identifies evidence recombination and two distinct lineages within *Corynebacterium diphtheriae*.** Dados não publicados.

Bonnet JM, Begg NT. (1999) **Control of diphtheria, guidance for consultants in communicable disease control.** *Communit Dis Public Health.* 2, 242-49

Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MTG, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J (2003) **The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129.** *Nucleic Acids Res.* 31: 6516-23.

Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PM, Kantardjieff K A, Collier RJ and Eisenberg D. (1992) **The crystal structure of diphtheria toxin.** *Nature.* 357, 216-22

Clarridge JE, Sprigel CA. ***Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix* and *Gardnerella*.** In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology Press, 1995; 357-373

Collier RJ and Kandel J. (1971) **Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments.** *J Biol Chem.* 246, 1496-503

De zoysa A, Efstratiou A, George RC, Jahkola M, Vuopio-Varkila J, Deshevoi S, Tseneva G, Rikushin Y. (1995) **Molecular Epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from Northwestern Russia and Surrounding Countries Studied by Using Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis.** *J Med Microbiol.* 33 (5), 1080-83

De Zoysa AS and Efstratiou A. (1999) **PCR typing of *Corynebacterium diphtheriae* by random amplification of polymorphic DNA.** *J Med Microbiol.* 48, 335-40

De Zoysa A and Efstratiou A. (2000). **Use of Amplified Fragment Length Polymorphisms for Typing *Corynebacterium diphtheriae*.** *J. Clin Microbiol.* 38, 3843–45

De Zoysa A, Hawkey PM, Engler K, George R, Mann G, Reilly W, Taylor D, Efstratiou A. (2005). **Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom.** *J Clin Microbiol.* 43(9), 4377-81

De Zoysa A and Efstratiou A. (2006). ***Corynebacterium* spp.** In, **Principles and Practice of Clinical Bacteriology.** (Eds. Emmerson A.M., Hawkey P.M. and Gillespie S.H). Second edition. John Wiley & Sons.

De Zoysa A, Hawkey P, Charlett A, Efstratiou A. (2008) **Comparison of Four Molecular Typing Methods for Characterization of *Corynebacterium diphtheriae* and Determination of Transcontinental Spread of *C. diphtheriae* Based on BstEII rRNA Gene Profiles.** *J Clin Microbiol.* 46 (11), 3626-35

DeWinter LM, Bernard KA, Romney MG. (2005) **Human Clinical Isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* Collected in Canada from 1999 to 2003 but Not Fitting Reporting Criteria for Cases of Diphtheria.** *J Clin Microbiol.* 43 (7), 344-49

Dias AA, Silva FC, Pereira GA, Souza MC, Camello TC, Damasceno JA, Pacheco LG, Miyoshi A, Azevedo VA, Hirata R, Bôas MH, Mattos-Guaraldi AL. (2010) ***Corynebacterium ulcerans* Isolated from an Asymptomatic Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* [Epub ahead of print]

Dixon B. (2010). **Sick as a dog.** *Lancet Infect Dis.* 10(2), 73.

Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V (2006) ***Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.** *Vet Res.* 37: 201-18.

Dorland RB, Middlebrook JL and Leppla SH. (1979) **Receptor-mediated internalization and degradation of diphtheria toxin by monkey kidney cells.** *J Biol Chem.* 254, 11337-42

Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuopio-Varkila J and Popovic T. (2000) **Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria.** *J Infect Dis.* 181, 138-45

Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, Sesardic D. (1998) **Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria.** *J Clin Microbiol.* 36(11), 3173-7.

Efstratiou A and George RC. (1996) **Microbiology and epidemiology of diphtheria.** *Rev. Med. Microbiol.* 7, 31–42

Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NP, Enright MC, Goldstein R, Hood D W, Kalia A, Moore CE, Zhou J and Spratt BG. (2001) **Recombination within natural populations of pathogenic bacteria, short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences.** *Proc Natl Acad Sci.* 98, 182-7

Formiga LCD. (1986) **Diagnóstico microbiológico da difteria.** *Rev. Bras. Patol. Clin.* 22, 52-58; 90-93; 122-130

Formiga LCD and Mattos-Guaraldi AL. (1993) **Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis.** *Rev Bras Pat Clin.* 29, 93-96

Freney J, Duperron MT, Courtier C, Hansen W, Allard F, Boeufgras JM, Monget D, Fleurette J.(1991) **Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria.** *J Clin Microbiol.* 29(1), 38-41

Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE and Bernard KA. (1997) **Clinical microbiology of Coryneform bacteria.** *Clin Microbiol Rev.* 10, 125-59

Gal-Mor O and Finlay BB (2006) **Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence.** *Cell Microbiol.* 8, 1707-19.

Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. (1998) **An Outbreak of Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection: Single Bacterial Clone Causing Invasive Infection Among Swiss Drug Users.** *Clin Infect Dis* 27, 1295–8

Grimont PAD, Grimont F, Efstratiou A, De Zoysa, A, Mazurova I, Ruckly C, Lejay-Collin M, Martin-Delautre S, Regnault B. and members of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. (2004) **International nomenclature for *Corynebacterium diphtheriae* ribotypes.** *Res Microbiol.* 155, 162-166

Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. (2000) **The pathology of diphtheria.** *J Infect Dis.* 181, S116-20

Hall AJ, Cassiday PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, Whitney AM, Iwaki M, Baldwin A, Dowson CG, Komiya T, Takahashi M, Hinrikson HP, Tondella ML. (2010) **Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats.** *Emerg Infect Dis.* 16(4), 688-91.

Halsey N. (1998) **Corynebacteria.** In: **Infectious diseases.** ed. S. Gorbach, J. Bartlett, N. Blacklow, 2nd ed., WB Saunders, Philadelphia, 1741- 47

Hatanaka A, Tsunoda A, Okamoto M, Ooe K, Nakamura A, Miyakoshi M, Komiya T, Takahashi M. (2003) ***Corynebacterium ulcerans* Diphtheria in Japan.** *Emerg Infect Dis.* 9(6), 752-3

Haubold B and Hudson RR. (2000) **LIAN 3.0, detecting linkage disequilibrium in multilocus data.** *Linkage Analysis. Bioinformatics.* 16, 847-8

Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL. (2008) **Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis.** *Braz J Med Biol Res* 41(11), 986-91

Hunter SB and Swaminathan B. (1998) **Ribotyping as a tool for molecular epidemiology. Rapid detection of infectious agents.** Edited by Specter et al. Plenum Press. New York.

Huson D and Bryant D. (2006) **Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies.** *Mol. Biol. Evol.* 23, 254-67

Jolley KA, Feil EJ, Chan MS and Maiden M. (2001) **Sequence type analysis and recombinational tests (START).** *Bioinformatics.* 17, 1230-31

Jolley KA, Wilson DJ, Kriz P, McVean G, Maiden MCJ. (2005) **The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis***. *Mol. Biol. Evol.* 22, 562–69

Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott N, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey DA, Rückert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegräbe I and Tauch A. (2003) **The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins**. *J Biotechnol.* 104, 5-25

Keen JH, Maxfield FR, Hardegree MC and Habig WH. (1982) **Receptor-mediated endocytosis of diphtheria toxin by cells in culture**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79, 2912-6

Koffas M and Stephanopoulos G. (2005) **Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology**. *Curr Opin Biotechnol.* 16, 361-6.

Kolodkina V, Titov L, Sharapa T, Grimont F, Grimont PA and Efstratiou A. (2006) **Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus**. *BMC Infectious Diseases.* 6, 1-7

Kombarova S, Kim C, Melnikov V, Reeves M, Borisova O, Mazurova I, Popovic T. (2001) **Rapid Identification of *Corynebacterium diphtheriae* Clonal Group Associated with Diphtheria Epidemic, Russian Federation**. *Emerg Infect Dis.* 7 (1), 133-36

Leggett BA, De Zoysa A, Abbott YE, Leonard N, Markey B, Efstratiou A. (2010) **Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse**. *Vet Rec.* 22; 166(21):656-7

Lemichez E, Bomsel M, Devilliers G, vanderSpek J, Murphy JR, Lukianov EV, Olsnes S, Boquet P. (1997) **Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery**. *Mol Microbiol.* 23(3), 445-57

Macambira RP, Formiga LB, Formiga LCD. (1994) **Difteria: o grave prognóstico brasileiro**. *J Bras Med.* 66: 69-81

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. and Spratt, B. G. (1998) **Multilocus sequence typing, a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3140-5

Miden MCJ. (2006) **Multilocus Sequence Typing of Bacteria.** *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561–88

Mattos-Guaraldi, AL and Formiga, LCD. (1991) **Relationship of byotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*.** *Braz J Med Biol Res* 24, 399 – 406

Mattos-Guaraldi, AL and Formiga, LCD. (1998) **Bacteriological Properties of a Sucrose-Fermenting *Corynebacterium diphtheriae* Strain Isolated from a Case of Endocarditis.** *Current Microbiology* 37, 156–58

Mattos-Guaraldi AL, Duarte Formiga LC, Pereira GA (2000) **Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*.** *Microbes Infect.* 2, 1507-12.

Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R (2003) **Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(8), 987-93

Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JLM, Santos CS, Pimenta FP, Pereira GA, Pacheco LGC, Miyoshi A, Azevedo V, Moreira LO, Gutierrez FL, Costa JLF, Costa-Filho R, Damasco PV, Camello TCF, Hirata Jr R. (2008) **First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 103(4), 396-400

Milkman, R. (1973) **Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources.** *Science.* 182, 1024-6

Ministério da saúde. (2009) **Difteria.** *Secretaria de vigilância em saúde/MS. Guia de Vigilância epidemiológica da Secretaria de Vigilância.* Caderno 3.24

Moreira Lde O, Andrade AF, Vale MD, Souza SM, Hirata R Jr, Asad LM, Asad NR, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Mattos-Guaraldi AL. (2003) **Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *Appl Environ Microbiol.* 69(10), 5907-13

Moskaug JO, Sletten K, Sandvig K, Olsnes S. (1989) **Translocation of diphtheria toxin A-fragment to the cytosol. Role of the site of interfragment cleavage.** *J Biol Chem.* 264, 15709-13

Moskaug JO, Stenmark H, Olsnes S. (1991) **Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions.** *J Biol Chem.* 266, 2652-9

Nakao, H. and Popovic, T. (1998). **Use of random amplified polymorphic DNA for rapid molecular subtyping of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 30, 167-172

Nakao H, Pruckler JM, Mazurova IK, Narvskaia OV, Glushkevich T, Marijevski VF, Kravetz AN, Fields BS, Wachsmuth IK, Popovic T. (1996) **Heterogeneity of diphtheria toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine.** *J Clin Microbiol.* 34(7), 1711-6

Naglich JG, Rolf JM, Eidels L. (1992a) **Expression of functional diphtheria toxin receptors on highly toxin-sensitive mouse cells that specifically bind radioiodinated toxin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 2170-4

Naglich JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L. (1992b) **Expression cloning of a diphtheria toxin receptor, identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor.** *Cell.* 69, 1051-61

Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E, Sugimoto S, Matsui K, Yamagishi A, Kikuchi H, Ikeo K, Gojobori T. (2003) **Comparative Complete Genome Sequence Analysis of the Amino Acid Replacements Responsible for the Thermostability of *Corynebacterium efficiens*.** *Genome Res.* 13, 1572-79

Oram DM, Avdalovic A, Holmes RK. (2002) **Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR).** *J Bacteriol.* 184(20), 5723-32.

Organização Mundial da Saúde. (2009) **WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system.** Expanded Programme on Immunization of the Department of Immunization, *Vaccines and Biologicals*

Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MNL, Oliveira SC, Meyer R, Alves FSF, Miyoshi A, Azevedo V (2007) **Multiplex PCR assay**

for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol.* 56, 480-6.

Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH, Efstratiou A. (1994) **Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin.** *J Clin Pathol.* 47(4), 353-6.

Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, Gimenez MN, Collins MD. (1995) **Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences.** *Int J Syst Bacteriol.* 45, 724-8

Patey O, Bimet F, Riegel P, Halioua B, Emond JP, Estrangin E, Dellion S, Alonso JM, Kiredjian M, Dublanquet A, Lafaix C. (1997) **Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. Coryne Study Group.** *J Clin Microbiol.* 35(2), 441-5

Popovic T, Kombarova SY, Reeves MW, Nakao H, Mazurova IK, Wharton M, Wachsmuth IK, Wenger JD. (1996) **Molecular epidemiology of diphtheria in Russia, 1985-1994.** *J Infect Dis.* 174, 1064-72

Popovic T, Mazurova IK, Efstratiou A, Vuopio-Varkila J, Reeves MW, De Zoysa A, Glushkevich T, Grimont P. (2000) **Molecular epidemiology of diphtheria.** *J Infect Dis.* 181, 168-77

Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. (2006) **Emergence of an Invasive Clone of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the Urban Poor Population of Vancouver, Canada.** *J Clin Microbiol.* 44 (5), 1625 - 29

Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. (2005) **Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol.* 43, 5642-7

Rozen S. and Skaletsky, H. (2000) **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol.* 132, 365-86

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. (2000) **Artemis: sequence visualization and annotation.** *Bioinformatics* 16(10), 944-5

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) **Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition.** *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.*

Sanger F, Nicklen S, Coulson, AR. (1977) **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Biochemistry* 74(12), 5463-76

Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andremont A. (1993) **Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol*, 31, 982-85

Sawyer, S. (1989) **Statistical tests for detecting gene conversion.** *Mol Biol Evol.* 6, 526-38

Schuhegger R, Linder Mayer M, Kugler R, Heesemann J, Busch U, Sing A. (2008) **Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR.** *J Clin Microbiol.* 46(8), 2822-3

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. (1986) **Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.** *Appl Environ Microbiol.* 5, 873-84

Sharma NC, Banavaliker JN, Ranjan R, Kumar R. (2007) **Bacteriological & epidemiological characteristics of diphtheria cases in & around Delhi -a retrospective study.** *Indian J Med Res.* 126(6), 545-52

Skogen V, Cherkasova VV, Maksimova N, Marston CK, Sjursen H, Reeves MV, Olsvik O, Popovic T. (2002) **Molecular Characterization of *Corynebacterium diphtheriae* isolates, Russia, 1957–1987.** *Emerg Infect Dis.* 8, 516-18

Sing A, Hogardt M, Bierschenk S, Heesemann J. (2003) **Detection of differences in the nucleotide and amino acid sequences of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* causing extrapharyngeal infections.** *J Clin Microbiol.* 41, 4848-51

Sulakvelidze A, Kekelidze M, Gomelauri T, Deng Y, Khetsuriani N, Kobaidze K, De Zoysa A, Efstratiou A, Imnadze P. (1999) **Diphtheria in the Republic of Georgia: Use**

of Molecular Typing Techniques for Characterization of *Corynebacterium diphtheriae* Strains. *J Clin Microbiol.* 37 (10), 3265-70

Tauch A, Kaiser O, Hain T, Goesmann A, Weisshaar B, Albersmeier A, Bekel T, Bischoff N, Brune I, Chakraborty T, Kalinowski J, Meyer F, Rupp O, Schneiker S, Viehoveer P, Pühler A. (2005) **Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora.** *J Bacteriol.* 187 (13), 4671-82

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995) **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J Clin Microbiol.* 33, 2233-39

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. (2007) **Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(3):495-548

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. (1995) **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-14

Wagner KS, White JM, Crowcroft NS, DE Martin S, Mann G, Efstratiou A. (2010) **Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*.** *Epidemiol Infect.* 9,1-12. [Epub ahead of print]

Wang Z, Schmitt MP, Holmes RK. (1994) **Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (dtxR).** *Infect Immun.* 62(5), 1600-8

Welsh J. and McClelland M. (1990). **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-18

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-35

Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB, Seferyńska I. (2005) **The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland, case report.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 4, 8

8. Anexo

Considerações Finais

8.1 Currículo Lattes