

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

AVALIAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS NO DESENVOLVIMENTO
DE DOENÇAS INVASIVAS POR AMOSTRAS TOXINOGÊNICAS E
ATOXINOGÊNICAS DE *Corynebacterium diphtheriae* E *Corynebacterium ulcerans*

Rio de Janeiro

2011

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

AVALIAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS NO DESENVOLVIMENTO
DE DOENÇAS INVASIVAS POR AMOSTRAS TOXINOGÊNICAS E
ATOXINOGÊNICAS DE *Corynebacterium diphtheriae* E *Corynebacterium ulcerans*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Ana Luíza de Mattos-Guaraldi

Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2011

Dias, Alexandre Alves de Souza de Oliveira

Avaliação de modelos animais experimentais no desenvolvimento de doenças invasivas por amostras toxinogênicas e atoxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* / Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011

135f. : il, tab

Orientadores: Ana Luíza de Mattos-Guaraldi e Maria Helena S. Villas Bôas
Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária,
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo
Cruz, 2011.

1. Difteria 2. *Corynebacterium ulcerans* 3. Artrite 4. Modelo Animal 5.
Infecção Invasiva

Evaluation of experimental animal models in the development of invasive infections by toxigenic and non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

AValiação de Modelos Animais Experimentais no Desenvolvimento
de Doenças Invasivas por Amostras Toxinogênicas e
Atoxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Ana Luíza de Mattos-Guaraldi

Maria Helena Simões Villas Bôas

Aprovado em: 11 / 02 / 2011

Verônica Viana Vieira (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ivano R. V. de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Raphael Hirata Junior (Doutor)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Ana Luíza de Mattos-Guaraldi (Doutor)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Luíza de Mattos-Guaraldi por absolutamente tudo.

À Dra. Maria Helena Simões Villas-Bôas pela amizade, suporte, gerenciamento e orientação.

À minha amiga, Dra. Maria Aparecida Affonso Boller, por todo apoio e amizade em mais esta etapa.

Ao amigo Feliciano Silva Júnior pela colaboração incansável.

Aos colegas do Departamento de Imunologia por sua grande ajuda em várias etapas.

Aos amigos Drs. Lúcia Maria Correia Werneck e Jarbas Emílio dos Santos por toda força e apoio.

À Dra. Eloísa Nunes pelo suporte quanto a avaliação histopatológica.

Aos amigos do INCQS que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Difteria e Corinebáctérias de Importância Clínica (LDCIC)-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À direção do INCQS pelo apoio a este trabalho.

Ào CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio a este trabalho.

Ào Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

RESUMO

Além dos quadros de difteria clássica, *Corynebacterium diphtheriae* tem sido isolado de diversos processos infecciosos invasivos. Escassos são os trabalhos que procuram investigar *in vivo* os fatores que influenciam o estabelecimento e/ou a disseminação de amostras potencialmente invasoras de *C. diphtheriae*. Além disso, na literatura encontramos a descrição de inúmeros casos de um patógeno potencialmente perigoso para a população o *Corynebacterium ulcerans*, que se apresenta como um desafio para os órgãos de Saúde Pública brasileiros que somente recentemente o incluíram na rotina dos esquemas de isolamento e identificação. O presente estudo teve como objetivos gerais investigar processos invasivos desencadeados por amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* potencialmente invasivas utilizando modelos experimentais em animais. Além de realizar a pesquisa de *C. ulcerans* em populações de caninos mantidos em instituição destinada ao abrigo de animais domésticos localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro. Neste sentido foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos: (i) Avaliação do potencial artritogênico de cepas de origens diversas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* através do modelo de artrite em murinos; (ii) Monitoramento em diferentes intervalos de tempo de microrganismos viáveis no sangue, pulmões, rins, fígado, baço, cérebro coração e articulações; (iii) Determinação dos níveis séricos de citocinas IL-6 e TNF- α decorrentes do processo infeccioso. Os resultados indicaram o modelo experimental de artrite em camundongos convencionais Swiss Webster infectados por via i.v. como mais adequado para a análise do potencial invasor das amostras. As 13 amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* estudadas apresentaram potencial artritogênico em intensidades variadas, independente da capacidade de produção de DNase, toxina diftérica e fosfolipase D (PLD). Dentre as amostras testadas, as de *C. diphtheriae* isoladas de casos de endocardite e *C. ulcerans* isoladas de processos infecciosos em humanos e animais apresentaram maior potencial artritogênico (> 50%) quando comparadas com aquelas de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* isoladas de quadros de difteria clássica e de cão assintomático, respectivamente. A análise histopatológica demonstrou a presença de edema subcutâneo, infiltrado inflamatório, danos ao tecido ósseo e hipertrofia de sinoviócitos, compatível com quadro de artrite severa para as amostras consideradas mais artritogênicas. Bactérias viáveis foram

recuperadas a partir do sangue, rins, fígado, baço e articulações. Ambas as espécies apresentaram quadros de poliartrite, sendo que os punhos e tornozelos foram as áreas mais frequentemente acometidas. As amostras de *C. ulcerans* 809 e CDC-KC279 além dos quadros de poliartrite apresentaram lesões articulares ulceradas e nodose na cauda com extensa necrose no sítio da inculação (veia caudal). A correlação entre o índice da artrite e os níveis sistêmicos de citocinas IL-6 e TNF- α foi observada para as cepas de *C. ulcerans*, com exceção da cepa BR-AD22 incapaz de produzir artrite. Em conclusão, foi demonstrado potencial artritogênico cepa-dependente para *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* indicando diferenças na virulência e no potencial invasor destas espécies e independente da capacidade de produção de toxina diftérica e de PLD.

Palavras-chave: Difteria, *Corynebacterium ulcerans*, artrite, modelo animal, infecção invasiva.

ABSTRACT

Corynebacterium diphtheriae has been isolated from several invasive infectious diseases besides diphtheria disease. Few reports attempt to explain *in vivo* the factors influencing the establishment and / or the spread of potentially invasive strains of *C. diphtheriae*. Moreover, a large number of cases of a potentially infectious pathogen, *Corynebacterium ulcerans*, have been described worldwide, which can be seen as a challenge for Brazilian public health agencies which only recently included the isolation and identification of this pathogen in routine microbiological analysis. Therefore, this study aims to investigate general processes caused by invasive strains of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* using experimental models in animals. An additional objective is to conduct a research on *C. ulcerans* in populations of dogs kept in domestic animal shelter located in the metropolitan region of Rio de Janeiro. Thus, we have proposed the following specific objectives: (i) assess the arthritogenic potential of various *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* strains by arthritis model in mice, (ii) monitor, at different time intervals, the presence of viable microorganisms in the blood, lungs, kidneys, liver, spleen, brain, heart and joints, (iii) determine serum levels of IL-6 and TNF- α under infectious process. The results indicated that the model of experimental infection in conventional Swiss Webster mice infected by IV route is suitable for the analysis of potential invasive strains. The 13 strains of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* showed arthritogenic potential on different levels, regardless of ability to produce DNase, diphtheria toxin and phospholipase D (PLD). Among the samples tested, *C. diphtheriae* isolated from cases of endocarditis and *C. ulcerans* isolated from infectious processes in humans and animals showed the greatest arthritogenic potential (> 50%) compared with the samples of *C. diphtheriae* isolated from classic diphtheria cases and *C. ulcerans* isolated from asymptomatic dogs. Histopathologic analysis showed the presence of subcutaneous edema, inflammatory reaction, damage to bone and synovial hypertrophy, consistent with a condition of severe arthritis for the samples considered more arthritogenic. Viable bacteria were recovered from the blood, kidneys, liver, spleen and joints. Both species caused polyarthritis, with wrists and ankles more often affected. The samples of *C. ulcerans* CDC-KC279 and 809 beside polyarthritis, produced ulcerated lesions at the affected joints and nodose in the tail with extensive

necrosis at the inoculation site (tail vein). The correlation between the arthritis and systemic levels of IL-6 and TNF- α was observed for the strains of *C. ulcerans*, with the exception of strain BR-AD22 that was unable to produce arthritis. In conclusion, our study showed a potential arthritogenic strain-dependent in *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* indicating differences in virulence and invasive potential of these species independent of the production ability of diphtheria toxin and PLD.

Key-words: Diphtheria, *Corynebacterium ulcerans*, arthrite, animal models, invasive infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Coeficiente de incidência da difteria e cobertura vacinal pela vacina DTP no Brasil (1990-2008).....	29
Figura 2	Esquema de triagem para amostras de bacilos Gram positivos irregulares.....	51
Figura 3	Distribuição mundial de casos notificados de infecções pelo <i>C. ulcerans</i>	52
Figura 4	Comparação entre duas linhagens de camundongos (NIH e SW) quanto à sua capacidade de apresentar sinais clínicos de artrite.....	68
Figura 5	Perfis artritogênicos das cepas ATCC 27010 (Atoxinogênico), ATCC 27012 (Toxinogênico) e PW8 (Vacinal) em camundongos Swiss Webster.....	69
Figura 6	Comparação da atividade artritogênica da cepa HC03 em diferentes grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster tratados previamente.....	70
Figura 7	Comparação da atividade artritogênica da cepa HC03 em diferentes grupos de camundongos da linhagem NIH tratados previamente.....	71
Figura 8	Avaliação da imunização com o complexo protéico 67-72p quanto ao estabelecimento de artrite séptica pela cepa de <i>C. diphtheriae</i> CDC-E8392.....	73
Figura 9	Perfis artritogênicos das cepas invasoras de <i>C. diphtheriae</i> HC01, HC02, HC03 e HC04.....	74
Figura 10	Perfis artritogênicos das cepas de <i>C. diphtheriae</i> 241/Brasil, 402/Brasil e PW8.....	75
Figura 11	Porcentagem de animais inoculados e que apresentaram sinais clínicos de artrite.....	76
Figura 12	Potencial artritogênico médio das amostras de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> utilizadas no estudo....	77
Figura 13	Dosagem de IL-6 e TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster desafiados com as cepas HC01, HC02 e HC03 de <i>C. diphtheriae</i>	79
Figura 14	Dosagem de IL-6 em soro de grupos de camundongos da linhagem SW desafiados com as cepas HC01, HC02, HC03 e CDC-E8392.....	80
Figura 15	Dosagem de TNF- α em grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster desafiados com cepa CDC-E8392.....	80
Figura 16	Comparação do perfil de liberação de IL-6 em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster tratados com toxóide diftérico (VAC), soro diftérico (SAD) e sem tratamento (CT) desafiados com a cepa HC03.....	81
Figura 17	Comparação do perfil de liberação de TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster tratados com toxóide diftérico	81

	(VAC), soro diftérico (SAD) e sem tratamento (CT) desafiados com a cepa HC03.....	
Figura 18	Percentagem de óbitos entre os animais infectados com as cepas de <i>C. ulcerans</i>	90
Figura 19	Percentagem dos animais da linhagem Swiss Webster que apresentaram sinais clínicos de artrite após infecção pelo <i>C. ulcerans</i> de acordo com as diferentes cepas estudadas.....	91
Figura 20	Incidência (A) e severidade (B) da artrite em camundongos infectados com 2×10^8 UFC por animal com as cepas de <i>C. diphtheriae</i> e <i>C. ulcerans</i>	93
Figura 21	Índices médios de artrite em grupos de camundongos infectados com 2×10^8 UFC por animal com as cepas de <i>C. diphtheriae</i> (ATCC27010 e ATCC27012) e <i>C. ulcerans</i> (809, CDC-KC279 e BR-AD22).....	93
Figura 22	Títulos médios obtidos nas dosagens de citocinas TNF- α (A) e IL-6 (B) obtidos por cada cepa em amostras de soro provenientes de grupos de camundongos convencionais Swiss Webster.....	96
Figura 23	Níveis de IL-6 (A) e TNF- α (B) detectados em soro de camundongos infectados pelas cepas de <i>C. diphtheriae</i> e <i>C. ulcerans</i> em diferentes intervalos de tempo pós infecção.....	97
Figura 24	Percentual de animais infectados e títulos médios das citocinas (TNF- α e IL-6) e obtidos por cada cepa em amostras de soro provenientes de grupos de camundongos convencionais Swiss Webster infectados pelas cepas de <i>C. ulcerans</i> (CDC-KC279, 809 e BR-AD22) e <i>C. diphtheriae</i> (ATCC27010 e ATCC 27012).....	98
Figura 25	Aspectos clínicos e Avaliação Histopatológica da artrite em camundongos Swiss Webster 8 dias após a infecção com cepas de <i>C. ulcerans</i> (A) e <i>C. diphtheriae</i> (B).....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos confirmados no Brasil por região (1997-2006).....	31
Tabela 2	Casos de infecções pelo <i>Corynebacterium ulcerans</i> em humanos relatados na literatura internacional.....	36
Tabela 3	Casos de infecções pelo <i>Corynebacterium ulcerans</i> e <i>Corynebacterium diphtheriae</i> em animais relatados na literatura internacional.....	41
Tabela 4	Origem e características biológicas de todas as amostras de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> estudadas.....	57
Tabela 5	Origem e características biológicas das amostras de <i>Corynebacterium ulcerans</i> utilizadas no estudo.....	62

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Autoagregativa
ACT	Ágar-chocolate-telurito
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Control
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissões de Ética no Uso de Animais
CT	Grupo controle
DALY	Disability-Adjusted Life Year
DE50	Dose Efetiva 50%
DIPNET	Diphtheria Surveillance Network
DL50	Dose Letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTP	Difteria, Tétano e Pertussis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	Endocardite infecciosa
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E.V.	Endovenosa
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HC	Hemocultura
HEp-2	Human epidermoid cancer cells
IC	Coeficiente de incidência
IDR	Ensaio de Imunodifusão Radial
IgG	Imunoglobulina G
I.P.	Intra-peritoneal
IL-6	Interleucina 6
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
mg	miligrama
mL	mililitro

MS	Ministério da Saúde
NIH	National Institute of Health
NIS	Novos Estados Independentes
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	picograma
PLD	Fosfolipase D
PNI	Programa Nacional de Imunização
PTN 67-72p	Complexo proteico de superfície 67-72p
PW 8	Cepa vacinal Park-Williams 8
RAPD	Amplificação randômica de DNA polimórfico
SAL	Setor de Animais de Laboratório
SAD	Tratados com soro antidiftérico
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SW	Swiss Webster
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TD	Toxina Diftérica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UERJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI	Unidades Internacionais
UFC	Unidades formadores de colônias
v	Volume
VAC	Vacinados pelo toxóide diftérico
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DIFTERIA CLÁSSICA – <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	13
1.1.1. Toxina diftérica	13
1.1.2. Aspectos epidemiológicos da difteria	14
1.1.3. Relação parasito-hospedeiro	19
1.1.4. Lesões cutâneas e portadores assintomáticos	20
1.1.5. Infecções invasivas	21
1.1.6. Propriedades adesivas e invasivas do <i>C.diphtheriae</i>	23
1.1.7. Situação atual no Brasil	28
1.2. <i>Corynebacterium ulcerans</i>	33
1.2.1. Aspectos microbiológicos	33
1.2.2. Aspectos epidemiológicos	33
1.2.3. Fatores de virulência	44
1.2.4. Aspectos clínicos	47
1.2.5. Situação atual no Brasil	48
1.3. RELAÇÃO COM A VIGILÂNCIA SANITÁRIA	53
2. OBJETIVOS GERAIS	54
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	54
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A <i>Corynebacterium ulcerans</i>	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	56
3.1.1. Considerações éticas	56
3.1.2. Origem, estocagem e cultivo das amostras bacterianas	56
3.1.3. Origem dos animais e modelos experimentais	57
3.1.4. Modelo intranasal	58
3.1.5. Endocardite experimental em cobaias	59
3.1.6. Artrite experimental em camundongos	59
3.1.7. Avaliação da participação do complexo proteico de superfície 67-72p no estabelecimento de processos invasivos	59
3.1.8. Dosagem de citocinas	60
3.1.9. Análise estatística	60
3.2. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO <i>Corynebacterium ulcerans</i>	61
3.2.1. Considerações éticas	61
3.2.2. Origem, estocagem e cultivo das amostras bacterianas	61
3.2.3. Artrite experimental em camundongos	62
3.2.4. Viabilidade de <i>C. ulcerans</i> nos órgãos e tecidos	62
3.2.5. Dosagem de citocinas	63
3.2.6. Avaliação histológica	63
3.2.7. Análise estatística	64
4. RESULTADOS	65
4.1. RESULTADOS REFERENTES A <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	65
4.1.1. Modelo intranasal	65
4.1.2. Endocardite experimental em cobaias	65
4.1.3. Artrite experimental em camundongos	66

4.1.3.1.	<i>Seleção de linhagem de camundongos a ser utilizada na pesquisa de atividade artrítogênica</i>	66
4.1.3.2.	<i>Atividade artrítogênica em camundongos Swiss Webster das cepas homólogas ATCC27010 (atoxinogênica) e ATCC27012 (toxinogênica) e da cepa vacinal PW8</i>	68
4.1.3.3.	<i>Comparação dos diferentes tratamentos no desenvolvimento de artrite séptica em grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster desafiados com a cepa de <u>C. diphtheriae</u> HC03</i>	69
4.1.3.4.	<i>Avaliação da influência de diferentes tratamentos no desenvolvimento de artrite séptica em grupos de camundongos da linhagem NIH desafiados com a cepa de <u>C. diphtheriae</u> HC03</i>	71
4.1.3.5.	<i>Avaliação da imunização com o complexo protéico de membrana de 67-72p quanto ao estabelecimento de artrite séptica por <u>C. diphtheriae</u></i>	72
4.1.3.6.	<i>Avaliação dos perfis de atividade artrítogênica de cepas atoxinogênicas invasoras de <u>C. diphtheriae</u></i>	73
4.1.3.7.	<i>Avaliação dos perfis de atividade artrítogênica de cepas de <u>C. diphtheriae</u> 241/Brasil, 402/Brasil e a cepa vacinal PW8</i>	74
4.1.3.8.	<i>Porcentagem de animais que apresentaram sinais clínicos de artrite após infecção por cada cepa de <u>C. diphtheriae</u> e de <u>C. ulcerans</u> utilizada no estudo</i>	75
4.1.3.9.	<i>Potencial artrítogênico de cada cepa utilizada no estudo</i>	76
4.1.4.	<i>Dosagem de citocinas</i>	77
4.2.	RESULTADOS REFERENTES A <i>Corynebacterium ulcerans</i>	82
4.2.1.	<i>Artigos completos publicados ou submetidos</i>	82
4.2.1.1.	<i>Artigo completo publicado</i>	82
4.2.1.2.	<i>Artigos completos submetidos à publicação</i>	89
4.2.2.	<i>Artrite experimental em camundongos</i>	89
4.2.2.1.	<i>Sítios atingidos pelo <u>C. ulcerans</u> após o desafio endovenoso</i>	91
4.2.2.2.	<i>Potencial artrítogênico durante infecção por <u>C. diphtheriae</u> e <u>C. ulcerans</u></i>	92
4.2.3.	<i>Produção de citocinas durante infecção por <u>C. diphtheriae</u> e <u>C. ulcerans</u></i>	94
4.2.4.	<i>Avaliação histológica</i>	99
5.	DISCUSSÃO	101
6.	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE A - Auxílios diretamente concedidos ao projeto	131
	APÊNDICE B - Trabalhos submetidos relacionados à Tese	132
	APÊNDICE C - Trabalhos publicados relacionados ao Tema	135
	APÊNDICE D - Apresentações em Congressos e Posters	139

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIFTERIA CLÁSSICA – *Corynebacterium diphtheriae*

A difteria é uma doença bacteriana toxêmica de evolução aguda, que permanece como uma importante causa de morbidade e letalidade em todo o mundo, inclusive em países em que foram implantados programas de imunização da população infantil contra o agravo da doença (PAPPENHEIMER, 1993, GALAZKA, 2000, KHAN et al., 2007, WANG; LONDON, 2009, BITRAGUNTA et al., 2010, MAN et al., 2010, SAYKIA et al., 2010)

A espécie *Corynebacterium diphtheriae* foi caracterizada em quatro subespécies - *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*. Esta subdivisão foi baseada na morfologia colonial em meio de cultivo ágar-chocolate-telurito (ACT), no padrão bioquímico de fermentação de carboidratos e no potencial de hemólise das amostras. A subespécie *gravis* é capaz de fermentar o amido e o glicogênio, enquanto que a subespécie *belfanti* se diferencia pela incapacidade de redução do nitrato (CLARRIDGE; SPRIGEL, 1995, FUNKE et al., 1997, EFSTRATIOU, 1998, FUNKE; BERNARD, 2007).

As pseudomembranas são frequentes nos sítios de infecção e são o resultado da combinação dos efeitos do crescimento bacteriano, produção de toxinas, necrose tecidual e resposta imune do hospedeiro. A descoberta desta ação sistêmica pela ação da toxina diftérica levou ao desenvolvimento da terapia baseada na antitoxina e toxóide diftérico como agente vacinal (PAPPENHEIMER, 1993, SALYERS; WHITT, 1994).

1.1.1. Toxina diftérica

As manifestações locais e sistêmicas da difteria têm sido relacionadas à ação da toxina diftérica (TD), que é o fator de virulência mais bem estudado do *C. diphtheriae* (PAPPENHEIMER, 1993, EFSTRATIOU; GEORGE, 1999, EFSTRATIOU

et al., 2000, WANG; LONDON, 2009, MAN et al., 2010). A TD apresenta uma dose letal mínima menor que $0,1\mu\text{gKg}^{-1}$ de peso corporal, sendo extremamente potente (PAPPENHEIMER, 1993). Não existem diferenças na produção de TD entre as subespécies, porém só são toxigenos os microrganismos que foram infectados por um bacteriófago temperado, específico, portador do gene *tox* (FUNKE et al., 1997).

Ao multiplicar-se na mucosa do trato respiratório superior, sua porta de entrada, o microrganismo produz a exotoxina de natureza protéica que possui tropismo pelo miocárdio, sistema nervoso central, rins e glândulas supra-renais (MACAMBIRA et al., 1994, HADFIELD et al., 2000).

1.1.2. Aspectos epidemiológicos da difteria

A difteria é uma doença de notificação compulsória e que pode acometer todas as pessoas não imunizadas ou parcialmente imunizadas, de qualquer idade, raça ou sexo. A proteção contra o *C. diphtheriae* pode ser naturalmente obtida através da passagem de anticorpos maternos pela barreira transplacentária durante os primeiros meses de vida do feto ou através de infecções assintomáticas (GUIA BRASILEIRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998, DURBACĂ, 1999). Entretanto, a imunidade adquirida é obtida através da vacinação com o toxóide diftérico e não com antígenos somáticos (Ex. vacina tríplice bacteriana - DTP contra difteria, tétano e coqueluche) (BONNET; BEGG, 1999, GALAZKA, 2000, SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – SESRJ, 2002). O nível de imunidade cai ao final da infância e adolescência, dependendo do calendário de vacinação e da reserva de *C. diphtheriae* na população (GALAZKA, 2000). Deste modo, um eficaz programa de vacinação é capaz de conter o avanço de epidemias, porém não erradica o estado de portador assintomático na população.

Apesar dos relevantes conhecimentos adquiridos durante os anos em diferentes áreas (microbiologia, patologia, medicina interna e preventiva), as estratégias disponíveis para erradicá-la ainda são insuficientes.

A imunidade gerada contra a difteria depende principalmente da presença de anticorpos da classe IgG, direcionados contra a TD, em níveis iguais ou superiores a

0,1UImL⁻¹ (VON HUNOLSTEIN et al., 2003, DAMASCO et al., 2005, PIMENTA et al., 2006).

Um eficaz programa de vacinação é capaz de conter o avanço de epidemias, porem não erradica o estado de portador assintomático na população. Assim, temos tanto a circulação de cepas atoxinogênicas quanto toxinogênicas. Um declínio parcial na imunidade de adultos aliado à falta de reforços vacinais e uma menor exposição ao bacilo contribuem para a ocorrência esporádica de epidemias (FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993, GALAZKA; ROBERTSON,1995).

O calendário de vacinação adotado no Brasil consiste em um esquema primário de três doses da vacina DTP a ser iniciado a partir de dois meses de vida, com intervalo de, pelo menos, 30 dias entre as doses (o ideal é o intervalo de dois meses) e com 1º reforço aplicado no prazo de 6 a 12 meses após a 3ª dose e o 2º reforço com 4-6 anos de idade. É recomendada, ainda, a administração de uma dose de reforço com a vacina dupla adulto (dT) a cada 10 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Na Era da Vacinação, têm sido observadas mudanças diversas na epidemiologia da difteria (GALAZKA, 2000, MATTOS-GUARALDI et al., 2003) que podem ser parcialmente justificadas pela prevalência de baixos níveis de IgG antitoxina diftérica na população de adolescentes e adultos (FARIZO et al., 1993, DAMASCO et al., 2005). Além das mudanças na faixa etária, têm sido observados casos de difteria sem a presença de pseudomembrana e casos de faringite e infecções invasivas de origens diversas em indivíduos previamente submetidos à vacinação, incluindo artrite, pneumonia, abscessos renais e endocardite (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA al., 1998a, DEWINTER et al., 2005). Casos de infecções invasivas têm sido predominantemente relacionados com amostras de bacilo diftérico atoxinogênicas (HONMA et al., 1989, MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998a, MATTOS-GUARALDI et al., 2001, DZUPOVA et al., 2005, HIRATA Jr et al., 2008).

Em 1990 uma epidemia de difteria emergiu na Federação Russa espalhando-se rapidamente pelos Novos Estados Independentes (NIS) e países Bálticos. Foi a maior epidemia registrada após o início da vacinação em massa, com 157 mil casos, respondendo por aproximadamente 80% dos casos reportados no mundo inteiro. O decréscimo da cobertura vacinal em crianças, a desorganização dos serviços de saúde associada à revolta política, a grande migração de civis e militares e precárias

condições higiênico-sanitárias ajudam a explicar tal ocorrência. Houve, ainda, uma clara predominância entre a população adulta com cinco mil óbitos registrados. A retomada das campanhas de vacinação controlou a situação voltando aos níveis anteriores à epidemia. A taxa de letalidade não apresentou alterações nas últimas décadas (5 a 10%), a maioria das mortes ocorreu 3 e 4 dias pós-infecção com a presença de membranas ou miocardite com predominância do biotipo *gravis* (GALAZKA; ROBERTSON, 1995, POPOVIC et al., 2000). O principal clone da epidemia do início dos anos 90 continua circulando na Rússia, Letônia, Lituânia e Bielorrússia (WAGNER et al., 2010).

Outras regiões foram acometidas por surtos epidêmicos na década de 90, tais como China (6.000 casos), Tajakistão (1.100 casos), Índia (56.000 casos) e Equador (centenas de casos) (GALAZKA; ROBERTSON, 1995, POPOVIC et al., 1996, MACQUEEN, 1997, VITEK; WHARTON, 1998, SINGH et al., 1999, DITTMAN et al., 2000).

SHARMA e colaboradores (2007) relataram a ocorrência de casos de difteria em Delhi (Índia) e arredores, entre 1998 e 2004, principalmente em crianças não vacinadas. Há urgência em se melhorar a cobertura vacinal, especialmente na comunidade mulçumana, tanto em crianças na idade pré-escolar quanto em adolescentes, uma vez que a difteria persiste nesta comunidade (BITRAGUNTA et al., 2010).

Vale também ressaltar a atual epidemia na Índia, onde a cobertura vacinal é inferior a 80%, com apenas 56% das crianças encontrando-se protegidas ($\geq 0,1\text{UI/mL}$) (BITRAGUNTA et al., 2010). Entre 1999 e 2004 ocorreram 400 casos suspeitos no Vietnã com 90 pacientes confirmados laboratorialmente. Neste episódio considerou-se prioridade imunizar crianças e ampliar campanhas de conscientização da população sobre a importância da higiene da pele (MURAKAMI et al., 2010). Alta taxa de letalidade, grande proporção de pacientes com complicações e ocorrência em jovens e adultos podem estar caracterizando estas epidemias (GALAZKA; ROBERTSON, 1995).

Mudanças na epidemiologia de difteria ocorrem em todo o mundo. Uma grande proporção de adultos tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento encontra-se susceptível à difteria. A imunidade induzida por vacinação diminui com o tempo, a menos que *booster* periódicos sejam aplicados ou que ocorra contato com *C. diphtheriae*. A contínua circulação de cepas de *C.*

diphtheriae toxinogênicas enfatiza a necessidade de estarmos alertas a fatores epidemiológicos, sinais clínicos e sintomas de difteria de modo que estes casos sejam rapidamente diagnosticados e tratados possibilitando a prevenção de epidemias pelos órgãos de Saúde Pública. A disponibilidade de toxóide diftérico diminuiu a incidência de difteria e a circulação de *C. diphtheriae* resultando em uma queda nos níveis de anticorpos por exposição natural. O nível de imunidade cai ao final da infância e adolescência, dependendo do calendário de vacinação e da reserva de *C. diphtheriae* na população.

A Organização Mundial de Saúde criou um índice denominado DALY (Disability-Adjusted Life Year), onde cada unidade representa um ano de vida saudável perdido, seja por doença, internação ou mesmo óbito (levando em conta a expectativa de vida de cada país) a cada 100.000 habitantes. Dados da OMS de 2002 sobre a letalidade e prevalência da doença relacionam as regiões do planeta com as maiores DALYs por difteria em todo mundo, como na América Central (Haiti (>50 DALYs) e República Dominicana (>15 DALYs)), África Sub-saariana (República Democrática do Congo e Serra Leoa (>15 DALYs), Sudão, Etiópia, Quênia, Zimbábue, Somália, Burkina Faso entre outros (>7 DALYs)), Ásia (Nepal e Myanmar (>15 DALYs), Índia, Paquistão, Bangladesh, Tailândia, Camboja e Malásia (>7 DALYs)) e na Europa (Letônia (>7 DALYs)). O Brasil, bem como as Américas do Sul e do Norte, a Europa ocidental e Oceânia apresentaram índices inferiores a 1 DALY (MAP, 2002).

O reaparecimento da difteria em países europeus alerta para epidemias de doenças imunopreveníveis em todo o mundo. A circulação de cepas toxinogênicas é um desafio para os países desenvolvidos e em desenvolvimento requerendo a manutenção de altas taxas de cobertura vacinal em crianças e adultos. A pior epidemia por difteria das últimas décadas forçou uma geração de clínicos, laboratórios e epidemiologistas em todo o mundo a lembrar velhas lições e desenvolver novos métodos de prevenção, controle e tratamento da difteria. Em países onde a incidência da doença permanece relativamente alta e a cobertura vacinal continua insuficiente, o suporte laboratorial deve ser implementado considerando-se as deficiências recorrentes neste segmento. Investimentos contínuos na melhoria das vacinas, estratégias de controle e novos métodos laboratoriais são fatores fundamentais para o controle da transmissão da doença.

Existe, na Europa, uma rede de vigilância em difteria a *Diphtheria Surveillance Network* (DIPNET) formada principalmente pelos laboratórios dos centros de referência nacionais. Um dos principais objetivos da DIPNET é disseminar procedimentos microbiológicos para detecção da difteria com a meta de harmonizar metodologias e resultados laboratoriais. Estudos colaborativos promovidos recentemente pela DIPNET demonstraram resultados inferiores aos obtidos anteriormente apontando que a queda no número de casos levou a uma diminuição na capacidade de isolamento, identificação e detecção da toxigenicidade nos últimos anos. Estes estudos auxiliam a DIPNET a monitorar a qualidade e segurança dos serviços prestados pelos laboratórios participantes da rede apontando problemas gerais e específicos de cada laboratório (WAGNER et al., 2010).

O diagnóstico rápido e preciso é fundamental na orientação aos serviços de saúde a serem prestados ao portador bem como na contenção de um potencial clone epidêmico e toxigênico (NEAL; EFSTRATIOU, 2009).

Embora a difteria seja considerada em declínio no Brasil, a doença permanece endêmica na maioria dos estados nas duas últimas décadas com taxa de letalidade entre 5% a 10%. Alta taxa de letalidade, grande proporção de pacientes com complicações e ocorrência em jovens e adultos têm caracterizado estas epidemias (GALAZKA; ROBERTSON, 1995, MATTOS-GUARALDI et al., 2003).

No Brasil, o grupo etário que apresenta o maior coeficiente de incidência (IC) de difteria é o de crianças em idade pré-escolar não imunizadas previamente. De 1980 a 1990, surtos esporádicos foram registrados nos estados de Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Amazonas e Santa Catarina. O Programa Nacional de Imunizações foi estabelecido no início da década de 1970 e o controle da difteria somente foi alcançado no final da década de 1990. Entretanto, em 2004, 19 casos de difteria foram reportados no país com IC de 0.01/100,000. Desde então, o Ministério da Saúde recomenda a vacinação de crianças aos 2, 4 e 6 meses de idade e aplicação de *booster* em adolescentes e adultos (FUNASA, 2002). Não há informação disponível quanto à cobertura vacinal de jovens e adultos no Brasil. Apesar da queda da incidência de difteria, o Brasil está muito distante de atingir o controle alcançado pelos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos foram notificados quatro casos anuais entre 1993 e 1998, número quarenta vezes inferior ao notificado no Brasil (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 1999).

1.1.3. Relação parasito-hospedeiro

O desenvolvimento de diversos processos infecciosos inicia-se com a instalação do microrganismo nas superfícies cutâneo-mucosas, sendo essa capacidade de colonizar as superfícies do hospedeiro consideradas como importante mecanismo de patogenicidade de várias bactérias (OFEK; DOYLE, 1994). Para a implantação de um microrganismo, é de suma importância a presença de estruturas de superfície bacterianas envolvidas na captação de nutrientes nos tecidos, ativação dos sistemas de defesa, degradação de substratos e adaptação das bactérias ao ambiente (MATTOS-GUARALDI et al., 1998b, MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 2001, OTT et al., 2010).

As condições imunológicas gerais do hospedeiro, a dose infectante e a virulência da amostra bacteriana parecem ser fatores adicionais que influenciam na sensibilidade à difteria dos indivíduos vacinados (POPOVIC et al., 2000).

A pior epidemia de difteria na era pós-vacinal requer atenção pelo incompleto entendimento da epidemiologia e fatores de virulência de *C. diphtheriae*. Fatores do hospedeiro como, imunidade antimicrobiana, podem contribuir para o potencial epidêmico de uma nova cepa introduzida no ambiente, porém fatores relacionados ao microrganismo também devem ser considerados. Entretanto fatores biológicos e genéticos que distinguem cepas endêmicas de cepas epidêmicas ainda não foram totalmente elucidados. O fato de clones epidêmicos serem responsáveis por uma série de epidemias com centenas de mortes em países industrializados reforça a idéia de que outros fatores, além da TD, desempenham papel importante neste processo. A ocorrência de difteria entre vacinados, o aumento dos casos de endocardite causada por clones invasivos atoxinogênicos associados à prevalência de um biotipo atípico de *C. diphtheriae* subsp. *mitisfermentador* de sacarose responsável por altas taxas de letalidade de difteria respiratória no Brasil, apontam para a necessidade de um maior conhecimento sobre estes fatores (MATTOS-GUARALDI et al., 2003).

Os efeitos sistêmicos da toxina são evitados pela imunização antidiftérica, no entanto esta não exerce qualquer influência na colonização pelo bacilo. É preocupante a circulação do bacilo atoxinogênico entre a população, visto que ele apresenta potencial epidêmico e é capaz de causar um processo infeccioso invasivo

incluindo casos de difteria clássica (PAPPENHEIMER; MURPHY, 1983, FORMIGA, 1985a).

Diferentes estudos com células epiteliais demonstraram a capacidade de internalização e viabilidade intracelular do *C. diphtheriae*, incluindo a participação de estruturas de superfície neste processo (HIRATA Jr et al., 2002, VALE, 2003). Estes autores relataram uma maior capacidade de internalização por amostra isolada de sangue de paciente que desenvolveu quadro de endocardite fatal do que por amostras isoladas de trato respiratório. Presume-se que os mecanismos de internalização contribuam para o estabelecimento e manutenção dos processos infecciosos causados pelo bacilo diftérico ajudando a atenuar a resposta do sistema imune ao microrganismo.

1.1.4. Lesões cutâneas e portadores assintomáticos

O *C. diphtheriae* é capaz de causar difteria cutânea, que ocorre a partir de uma lesão na pele, onde o bacilo se multiplica (FORMIGA, 1985b, CLARIDGE; SPRIGEL, 1995). A difteria cutânea tem sido relacionada a taxas de isolamento que variam de 10% a 50%, dependendo da localização geográfica, sendo as amostras atoxinogênicas as principais responsáveis pelo aumento deste tipo de infecção (FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993). Em regiões endêmicas, as infecções de pele servem como reservatório do bacilo, particularmente quando não identificadas (BELSEY; LÊ BLANC, 1969, BELSEY et al., 1975).

A maioria das lesões que contém o bacilo diftérico são indistinguíveis de outras lesões dermatológicas e são mais contagiosas que a infecção do trato respiratório (DIXON, 1984, MACGREGOR, 1990). Alguns grupos estão mais sujeitos às infecções invasivas a partir de lesões cutâneas que albergam os microrganismos, como pacientes portadores do vírus-HIV, imunocomprometidos, usuários de drogas, e portadores de câncer (HALIOUA et al., 1992, GRUNER et al., 1994, MATTOS-GUARALDI et al., 2001). Além disso, amostras de *Corynebacterium ulcerans* que predominantemente causam lesões cutâneas em homens e animais, também mimetizam quadros de difteria clássica (KISELY et al., 1994, WAGNER et al., 2001, HATANAKA et al., 2003, VAN DAM et al., 2003).

Com o objetivo de verificar a prevalência do bacilo diftérico em lesões cutâneas, crianças em idade escolar do Rio de Janeiro foram examinadas. Observou-se que 15,09% possuíam o bacilo colonizando a pele, e que dentre este percentual 13,9% apresentaram o bacilo atoxinogênico. Diversos autores relataram o encontro de *C. diphtheriae* em úlceras leishmanióticas cutâneas (FORMIGA et al., 1986, FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993, VERA et al., 2001, VERA et al., 2002).

As amostras isoladas de lesões cutâneas, de acordo com Formiga (1986), Mattos-Guaraldi; Formiga (1991a) e Mattos-Guaraldi; Formiga (1991b), apresentaram diferenças nas propriedades adesivas quando comparadas às de trato respiratório. Amostras provenientes de ambos os sítios foram capazes de aglutinar hemácias de carneiro, sendo as amostras de trato respiratórios mais eficazes. Quando foi comparada a atividade hemaglutinante de amostras provenientes de lesões de pele com as do biotipo não fermentador de sacarose, observou-se que ambas reagiram fortemente com eritrócitos, sugerindo uma relação associativa entre o biotipo que não metaboliza sacarose e o sítio de infecção do *C. diphtheriae*. Tais ocorrências podem indicar a presença de um componente comum na superfície das amostras sítidas em diferentes locais, que seria responsável pela aderência do microrganismo e explicaria a colonização de um sítio ou outro (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991a, MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991b).

1.1.5. Infecções invasivas

A capacidade de produzir doenças invasivas adiciona um novo aspecto atípico ao processo infeccioso causado por *C. diphtheriae*. O bacilo diftérico tem sido relacionado com quadros de sepse, endocardite, osteomielite, artrite e pneumonia (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998a, MATTOS-GUARALDI et al., 2001, DZUPOVA et al., 2005, HIRATA Jr et al., 2008, HONMA et al., 2009). Quadros de infecções sistêmicas já foram relacionados com amostras do biotipo fermentador e não fermentador de sacarose (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998b). Além disso, amostras toxinogênicas e atoxinogênicas têm sido relacionadas em diversos casos de endocardite, entretanto, a toxinogenicidade não foi associada diretamente

ao poder invasor do microrganismo (BELKO et al., 2000). Segundo MISHRA e colaboradores (2005), a ocorrência de endocardite por *C. diphtheriae* talvez seja mais comum do que se supõe. A presença de fatores de risco não é necessária para o desenvolvimento do quadro (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998a).

HIRATA Jr e colaboradores (2008) relataram que amostras isoladas de pacientes com endocardite, em diferentes períodos e em distintas unidades nosocomiais do Rio de Janeiro, apresentaram similaridade nos perfis de proteínas totais, sendo agrupadas em um mesmo padrão eletroforético. No entanto, os microrganismos exibiram características moleculares diferentes quando foram analisados através da técnica de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD-PCR). A maioria das cepas invasivas foi classificada como toxinogênicas (Elek-positivas) e fermentadoras de sacarose.

Além da difteria clássica, cepas de *C. diphtheriae* têm sido cada vez mais associadas a quadros de infecções invasivas como endocardites, e artrites sépticas, septicemia, pneumonias e abscessos esplênicos. Cepas toxinogênicas produzem manifestações sistêmicas tais como miocardite, polineurite e necrose focal de órgãos como fígado, baço, rins e glândulas adrenais. Entretanto, a patogenia destas doenças ainda não está totalmente esclarecida e vem sendo postulado que ocorre com maior frequência em indivíduos previamente imunizados, particularmente em adultos (BELKO et al., 2000, KANUNGO et al., 2002). A endocardite infecciosa (EI) representa um desafio quanto ao diagnóstico com taxa de letalidade significativa (35%) ocorrendo em pacientes sem um histórico prévio de doença cardíaca. Maior conhecimento quanto a sua origem e evolução contribuiriam para a rapidez do diagnóstico e conseqüente aumento da taxa de recuperação (LEWENA, 2005). O *C. diphtheriae* aparenta ter predileção pelas válvulas do lado esquerdo do coração, especialmente pela válvula mitral, tendendo a produzir vasta vegetação valvular, embolia séptica e aneurismas frequentemente fatais (BELKO et al., 2000).

A EI é uma infecção crônica severa não-contagiosa das válvulas do coração causadas principalmente por bactérias. Várias complicações podem ser associadas à EI como: coágulos, acidente cardiovascular, problemas no ritmo cardíaco, abscessos e outras infecções. A EI é associada a quadros clínicos severos e morte, e geralmente ocorre em pacientes com estrutura do coração anormal ou alterada que foram expostos à bactérias por meio de trauma ou outras atividades de alto risco. O risco de infecção das válvulas cardíacas em pessoas predispostas a EI

aumenta com as seguintes condições: doença congênita cardíaca, febre reumática, tratamento dentário prolongado, cirurgias cardíacas e procedimentos geniturinários. Novas evidências mostram que o uso de *piercing*, consumo excessivo de álcool e utilização de drogas ilícitas intravenosas auto-administradas predispõem à endocardite (MILLAR; MOORE, 2004).

Em 1893 foi descrito o primeiro caso de endocardite causado pelo bacilo diftérico atoxinogênico. Na década de 70, foram relatados dois casos de endocardite causados por *C. diphtheriae* em crianças entre 4 a 5 anos de idade, sendo um deles fatal (DAVIDSON et al., 1976). Diversos estudos demonstram que tanto amostras de *C. diphtheriae* subsp. *gravis* quanto subsp. *mitis* foram capazes de causar endocardite (TILEY et al., 1993, MATTOS-GUARALDI et al., 2003). No Rio de Janeiro, amostras toxinogênicas de *C. diphtheriae*, têm sido isoladas de casos de endocardite em diferentes unidades nosocomiais (PEREIRA, 2001, VALE, 2003, SABBADINI, 2006). Apesar do poder destrutivo das infecções invasivas, vários aspectos dos mecanismos de patogenicidade de cepas invasivas de *C. diphtheriae* permanecem desconhecidos (BELKO et al., 2000, MATTOS-GUARALDI et al., 2000). Em todo o mundo, cepas invasivas de *C. diphtheriae* vêm sendo reportadas como causadoras de um aumento do número de casos de endocardites bacterianas, pneumonias, bacteremias, osteomielites e abscessos esplênicos (TYLEI et al., 1993, BELKO et al., 2000, LEWENA, 2005, PULITI et al., 2006).

1.1.6. Propriedades adesivas e invasivas do *C. diphtheriae*

A capacidade de invasão das células eucarióticas e de sobrevivência em seu interior são compartilhadas por muito patógenos humanos. O processo de invasão pode ser um meio utilizado pelos microrganismos para violar as barreiras epiteliais do hospedeiro e assegurar sua replicação e persistência (FINLAY; FALKOW, 1997, NIEMANN et al., 2004). A penetração de microrganismos invasores no ambiente intracelular ocorre através da participação de uma classe especial de adesinas, denominadas de invasinas (FINLAY; FALKOW, 1997, CHHATWAL, 2002, NIEMANN et al., 2004). Há inúmeros relatos sobre a dependência de uma ação cooperativa de adesinas e invasinas presentes na superfície bacteriana no processo de

internalização de bactérias aderentes (JOUVE et al., 1997). É importante ressaltar que fatores como afinidade da interação ligante-receptor, densidade da molécula receptora (avidéz) e associação desta ao citoesqueleto parecem ter grande importância na determinação do destino da bactéria aderida à superfície celular. Desta forma, a associação entre ligantes bacterianos e receptores da célula hospedeira nem sempre resulta na internalização do microrganismo (ISBERG, 1991).

A atividade da invasina não está restrita às moléculas presentes na superfície do microrganismo, visto que moléculas secretadas também podem possuir tal característica (CLERC; SANSONETTI, 1987). Proteínas efetoras podem ser liberadas dentro ou na superfície celular, auxiliando na penetração de microrganismos patogênicos (IRETON; COSSART, 1998).

A expressão de certas proteínas de superfície por parte das bactérias e a ligação destas a determinados receptores da célula hospedeira são requeridas para que haja contato e adesão, visto que estes são passos iniciais para a ocorrência da internalização bacteriana (COSSART; SANSONETTI, 2004, NIEMANN et al., 2004). Um grande número de adesinas/invasinas teve sua estrutura tridimensional estudada, sendo demonstrado que são moléculas alongadas contendo domínios comumente encontrados em proteínas eucarióticas (NIEMANN et al., 2004).

De um modo geral, as proteínas envolvidas na aderência e invasão estão ancoradas à superfície da bactéria, sendo o posicionamento diferente quando se compara microrganismos Gram positivos e Gram negativos (CHHATWAL, 2002, NIEMANN et al., 2004).

Diferenças quanto à capacidade de adesão das diversas cepas de difteria pode estar relacionada à prevalência de cepas epidêmicas, invasoras e/ou alguns biotipos sobre os demais (MATTOS-GUARALDI et al., 2000). A adesão é atividade importante para colonização e patogenicidade da espécie bacteriana. Embora o bacilo diftérico seja geralmente considerado um colonizador extracelular, a capacidade de sobrevivência do *C. diphtheriae* no interior de células epiteliais poderia ajudar a explicar a permanência da infecção no trato respiratório, apesar da terapia antimicrobiana e administração de antitoxina diftérica (HIRATA Jr et al., 2002).

Tem sido postulado que a difteria é uma infecção superficial causada por microrganismo não invasor. Contudo, a incidência de infecções sistêmicas causadas

por *C. diphtheriae* enfatiza a possibilidade do microrganismo ser capaz não apenas de aderir à superfície de células epiteliais da mucosa respiratória, mas também de invadir e acessar tecidos mais profundos (MATTOS-GUARALDI et al., 2000, HIRATA Jr et al., 2002).

A aderência do *C. diphtheriae* apresenta natureza multifatorial, uma vez que as amostras possuem tendência a aderir em intensidades variadas a diversos substratos. Aparentemente, as propriedades adesivas contribuem como fator de virulência no estabelecimento de infecções causadas por amostras invasoras, ou produtoras ou não de toxina. A expressão de diferentes adesinas pelo bacilo diftérico é sugerida, devido à diversidade da atividade hemaglutinante e as variações nos percentuais de aderência e internalização celular entre as amostras. Essas diferenças parecem influenciar na patogenicidade e no sítio de infecção das cepas (HIRATA Jr et al., 2008).

A definição do papel específico de uma adesina em particular na doença tem sido dificultada, já que um único patógeno expressa vários fatores de aderência. Alguns dos primeiros enfoques e novos desenvolvimentos nos estudos de base molecular do processo de adesão do *C. diphtheriae* são enfocados pela discussão da importância das hemaglutininas, exposição a açúcares, hidrofobinas e enzimas *trans*-sialidase como adesinas de cepas fermentadoras ou não de sacarose.

O papel de estruturas de superfície na aderência a células epiteliais, refletidos pela interação com eritrócitos, pode ser essencial ao progresso de uma infecção (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Estudos anteriores mostraram que adesinas e hemaglutininas foram expressas predominantemente no biotipo não fermentador da sacarose, isolado em maior frequência em lesões de pele (MATTOS-GUARALDI et al., 2000).

Dentre as estruturas de superfície de *C. diphtheriae* relacionadas à aderência e/ou invasão, destaca-se um complexo proteico de superfície, não fimbrial de aproximadamente 67 a 72 kDa, chamada PTN 67-72p. A PTN 67-72p foi caracterizada como uma adesina envolvida na interação do bacilo diftérico com eritrócitos humanos, induzindo a atividade hemaglutinante, influenciada pela presença de resíduos de açúcar expressos na superfície do *C. diphtheriae* (COLOMBO et al., 2001). Estudos realizados por SABBADINI e colaboradores em 2006, e HIRATA Jr e colaboradores em 2002, em ensaios de interação com células epiteliais respiratórias HEp-2, sugerem a participação de domínios preferenciais de

interação dos polipeptídeos 67-72p com a superfície das células eucarióticas no processo de aderência do bacilo.

O processo de internalização requer passos iniciais que incluem contato e adesão entre o microrganismo e a célula hospedeira. As estratégias para internalização desenvolvidas pelos patógenos permitem que atravessem barreiras teciduais e proliferem em locais protegidos, evitando a ação de antibióticos e escapando de defesas do hospedeiro, como anticorpos circulantes e complemento, e também possibilitam a ocorrência da doença (BIERNE; COSSART, 2002). Evidências que suportam o potencial invasivo de *C. diphtheriae*, por análises quantitativas e qualitativas, têm sido documentadas (HIRATA Jr et al., 2002). É provável que o processo de internalização também seja de importância na manutenção do patógeno nas vias aéreas superiores, até que o mesmo assuma uma posição majoritária dentro do ecossistema da microbiota, sendo pressuposta uma participação das invasinas. A elucidação dos aspectos moleculares dos processos pelos quais o bacilo diftérico adere e penetra em células epiteliais poderá levar ao desenvolvimento de estratégias efetivas para prevenir a emergência e recorrência de infecções.

É importante ressaltar que, além de permitir proteção temporária para os microrganismos infectantes contra os mecanismos de defesa, o compartimento intracelular pode funcionar também como via de dispersão para os tecidos mais profundos, através de transcitose (STINS et al., 2001). Segundo HIRATA Jr e colaboradores (2004), os fatores que conferem os diferentes padrões de aderência podem representar distintas adesinas expressas pelos isolados de *C. diphtheriae*.

Diversos fatores como temperatura e concentração de nutrientes são capazes de influenciar não só nos processos de aderência e invasão, mas também na expressão de fenótipos de aderência e de moléculas de superfície de diferentes espécies (MOREIRA et al., 2003). Amostras de bacilo diftérico crescidas em condições de limitação do ferro apresentaram atividades hemaglutinantes e de aderência as células HEp-2 favorecidas, além de um aumento na hidrofobicidade. Tais resultados enfatizam a hipótese de que as estruturas de superfície poderiam estar induzindo o mascaramento das moléculas envolvidas nas propriedades adesivas e de autoagregação.

A PTN 67-72p também foi capaz de induzir efeito citopático em células HEp-2, causando vacuolização citoplasmática, efeito que normalmente precede a

citotoxicidade induzida por bactérias. Estes efeitos, incluindo alterações no material nuclear, rompimento das junções intercelulares e morte celular, foram previamente observados em estudos com amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, as quais exibiam o fenótipo AA (VALE, 2003). Aparentemente, a responsabilidade pela citotoxicidade, em particular pelo fenômeno de vacuolização, não está em total relação com a produção de toxina diftérica (HIRATA Jr et al., 2002). BERTUCCINI e colaboradores (2004) também observaram a indução do processo de vacuolização em células epiteliais por amostras de bacilos diftéricos não produtores de toxina.

O esclarecimento dos mecanismos de interação deste microrganismo poderá, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento das infecções causadas por esta espécie. Os ligantes expressos na superfície do *C. diphtheriae* podem representar alvos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, tais como vacinas ou bloqueadores de aderência e/ou invasão. Vacinas multivalentes que induzam resposta mediada por anticorpos direcionados contra a toxina e as proteínas poderão, concomitantemente, prevenir o estado toxêmico e interferir com a aderência do bacilo diftérico. A imunoproteção contra a aderência do bacilo diftérico poderia reduzir o índice de portadores assintomáticos e a circulação dos clones epidêmicos, permitindo, deste modo, o controle mais efetivo da doença, o que não se consegue com a atual estratégia de vacinação contra a difteria, direcionado ao estado toxêmico (SABBADINI, 2006).

A permanente circulação mundial de amostras do bacilo diftérico apresentando potencial epidêmico e/ou invasor reforça a necessidade de estudos adicionais relativos aos mecanismos de aderência e invasão celular (VALE, 2003, FILARDY, 2005, HIRATA Jr et al., 2008).

O crescente aumento no isolamento de microrganismos atoxinogênicos a partir de quadros invasivos, em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes é relatado, sugerindo a necessidade do estudo de possíveis fatores de virulência diferentes da TD (REACHER et al., 2000, GOMES et al., 2009). Amostras de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina também são capazes de ser internalizadas pelas células epiteliais *in vitro* (BERTUCCINI et al., 2004).

1.1.7. Situação atual no Brasil

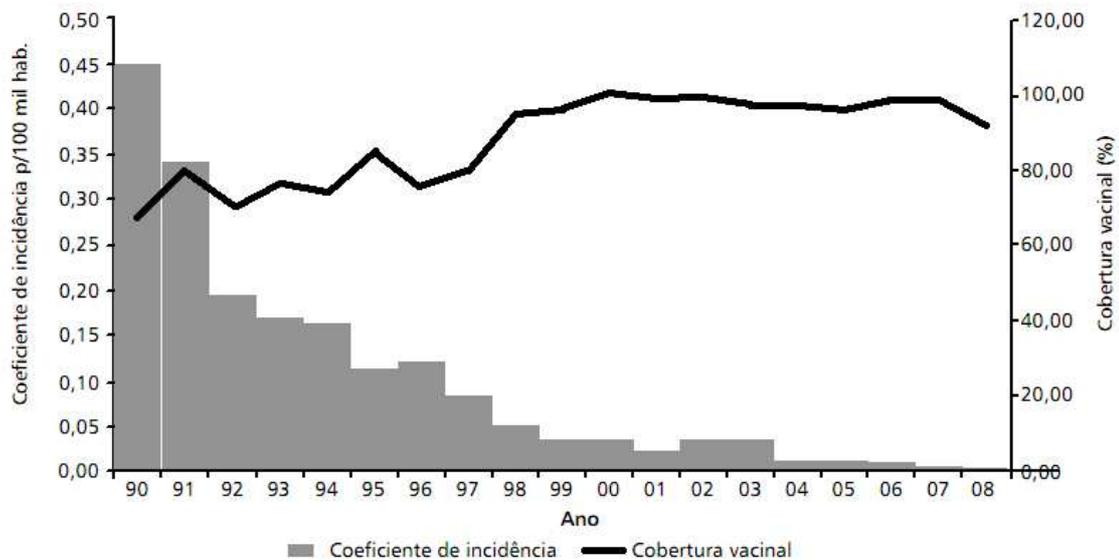
No Brasil, o Programa Nacional de Imunizações foi estabelecido no início da década de 70 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 1999, FUNASA, 2002). Entretanto, ainda na última década, ocorreram casos de difteria nos seguintes estados do território brasileiro: Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Atualmente a cobertura vacinal atinge 99% da população infantil, entretanto, no ano de 2008/09 foram confirmados 89 casos de difteria. No ano de 2010, ocorreu um surto epidêmico no Estado do Maranhão (SANTOS et al., 2010), os dados reafirmaram que a maior incidência de difteria ainda é observada no grupo de crianças em idade pré-escolar e não imunizadas.

Alguns autores mostram a circulação de *C. diphtheriae* em nossa população (MATTOS-GUARALDI et al., 2003) com apenas 30% dos adultos completamente protegidos (DAMASCO et al., 2005).

A **Figura 1** apresenta um gráfico relacionando o coeficiente de incidência com a cobertura vacinal alcançada ao longo dos mais de 40 anos de campanha contra a difteria em território nacional. Observa-se que apesar de atingir uma cobertura em torno de 99% da população não se consegue erradicar a doença em nosso país devido à adaptabilidade do bacilo às novas condições que se apresentam em nosso cotidiano.

O número de casos de difteria notificados no Brasil vem decrescendo progressivamente, provavelmente em decorrência do aumento da utilização da vacina DTP. Em 1990, foram notificados 640 casos, com coeficiente de incidência de 0,45/100 mil habitantes, número que foi progressivamente decaindo até atingir 56 casos em 1999 (coeficiente de incidência de 0,03/100 mil habitantes) e 58 casos em 2000 (coeficiente de incidência de 0,03/100 mil habitantes). Nos anos subsequentes, o número de casos não ultrapassou 50 por ano e o coeficiente de incidência por 100 mil habitantes manteve-se em torno de 0,03. Em 2003, confirmaram-se 40 casos da doença, com coeficiente de incidência de 0,02/100 mil habitantes. A cobertura

vacinal com a DTP vem se elevando neste período, passando de 66%, em 1990, para 95%, em 2003. A letalidade esperada varia de 5% a 10%, atingindo 20% em certas situações. No Brasil, este indicador tem apresentado elevações e diminuições, sendo de 8,6%, 18,8% e 22%, em 2000, 2001 e 2002, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



Fonte: SVS/MS

Figura 1. Coeficiente de incidência da difteria e cobertura vacinal pela vacina DTP no Brasil (1990-2008).

Apesar da excelente taxa de cobertura, SIMONSEN e colaboradores (1986), afirmam que a concentração de anticorpos protetores em indivíduos adultos decresce 10% ao ano. A importância de programas de reforço vacinal na população adulta foi comprovada por ÖLANDER e colaboradores (2009) na Finlândia. Dados disponíveis na literatura relativos à cobertura vacinal de indivíduos jovens e adultos no Brasil são escassos. Investigações soro-epidemiológicas demonstraram diferenças nos níveis de proteção contra a doença entre indivíduos residentes nos diferentes estados brasileiros. Em estudo realizado em São Paulo foi demonstrado que todos os indivíduos entre 10 e 20 anos receberam o esquema vacinal infantil e apenas 23,1% deles não receberam doses de reforço nos últimos 10 anos. Além disso, 86% apresentaram-se imunes contra a difteria (DINELLI et al., 2007). Outro

estudo demonstrou que 84% da população analisada, de diversas faixas etárias, estava completamente protegida contra a difteria (DIVINO-GOES et al., 2007). Por outro lado, estudos realizados no Rio de Janeiro relataram a susceptibilidade à difteria da população de adultos sadios de diferentes faixas etárias (DAMASCO et al., 2005, PIMENTA et al., 2006, SPERANZA et al., 2010). A susceptibilidade à difteria em adultos também tem sido observada em outros países como a Turquia (CAVUS et al., 2007). Estes dados enfatizaram a importância da aplicação de doses de reforço com o toxóide diftérico a fim de evitar decréscimos nos níveis de anticorpos da população (CAVUS et al., 2007, DINELLI et al., 2007).

Embora a difteria esteja entre as doenças mais bem estudadas, a preocupação dos órgãos de saúde pública com a possibilidade de uma pandemia é constante, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Tal fato se deve a permanência do agente etiológico circulando na população (GUBLER et al., 1990, EFSTRATIOU; GEORGE, 1998, GOLAZ et al., 2000, DEWINTER et al., 2005, DE ZOYZA et al., 2005). Segundo GOLAZ e colaboradores (2000), o *C. diphtheriae* toxinogênico permaneceu na comunidade, apesar de decorridos 20 anos sem o relato de casos de difteria em Dakota do Sul, EUA. DEWINTER e colaboradores (2005) mencionaram o Canadá como um potencial reservatório de amostras de bacilo diftérico produtoras de toxina. Todos estes casos enfatizam, mais uma vez, a necessidade de novas estratégias de vacinação mais eficazes, direcionadas a indivíduos de todas as idades e de diferentes grupos étnicos, uma vez que a introdução de amostras toxinogênicas em uma população susceptível pode resultar em um surto de difteria (GOLAZ et al., 2000).

Devido à severidade dos quadros clínicos causados pelas cepas de *C. diphtheriae*, torna-se importante a identificação cuidadosa das amostras de bastonetes Gram positivos nos laboratórios de microbiologia clínica, visto que as amostras fermentadoras de sacarose são passíveis de serem confundidas com difteróides e identificadas como *Corynebacterium* spp, principalmente quando provenientes de pacientes que não apresentam sinais e sintomas de difteria, mas que portam o bacilo atoxinogênico (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991b). PIMENTA e colaboradores (2008c) relataram a utilidade do teste de DNase na diferenciação de *C. diphtheriae* de outros corineformes na rotina de laboratórios de microbiologia. A importância de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do *C. diphtheriae* e diferenciação de amostras atoxinogênicas das

toxinogênicas também foi ressaltada (PIMENTA et al., 2008a, PIMENTA et al., 2008 b).

No Brasil, apesar do número decrescente, casos de difteria ocorrem em diversas regiões todos os anos (**Tabela 1**) muito embora não possamos contar com um sistema de vigilância apropriado e que minimize as subnotificações. Estes dados nos levam a crer na ocorrência desubnotificações, ainda mais se levarmos em conta as diferenças regionais tão marcantes em nosso país.

Tabela 1. Casos confirmados no Brasil por região (1997-2006).

Casos confirmados de difteria. Brasil e Grandes Regiões, 1997 - 2006

Região e UF	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Região Norte	20	4	13	16	4	6	4	1	4	2
Rondônia	0	0	0	3	0	1	0	1	0	0
Acre	5	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Amazonas	15	3	13	11	4	5	4	0	0	0
Roraima	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pará	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Região Nordeste	48	29	18	19	13	27	14	8	10	3
Maranhão	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	1	0	0	2	1	0	1	2
Paraíba	4	6	2	5	2	0	0	0	0	1
Pernambuco	5	1	3	1	1	4	1	0	0	0
Alagoas	7	7	5	1	0	3	0	0	0	0
Sergipe	5	0	0	1	4	0	1	0	1	0
Bahia	27	14	6	8	6	18	10	8	8	0
Região Sudeste	25	16	13	10	8	17	15	6	8	4
Minas Gerais	6	4	0	2	1	6	1	0	0	2
Espírito Santo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	5	4	2	4	5	6	1	3	3	2
São Paulo	13	8	11	4	2	5	13	3	5	0
Região Sul	36	25	11	7	3	3	10	2	3	0
Paraná	1	2	1	1	0	0	1	0	3	0
Santa Catarina	5	3	2	4	0	1	3	0	0	0
Rio Grande do Sul	30	20	8	2	3	2	6	2	0	0
Região Centro-Oeste	11	7	3	6	2	0	3	2	0	0
Mato Grosso do Sul	3	4	2	3	2	0	3	0	0	0
Mato Grosso	2	1	1	3	0	0	0	2	0	0
Goiás	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	140	81	58	58	30	53	46	19	25	9

Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 30/10/07

No Brasil, a difteria ainda pode ocorrer em crianças com esquema de vacinação com DTP incompleto e na idade pré-escolar (GUIA BRASILEIRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Condições de higiene e saneamento precárias, assim como imunização incompleta da população ocasionaram, na década de 80, surtos isolados em algumas regiões do Brasil, como Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Amazonas e Santa Catarina (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991b, FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993, MACAMBIRA et al., 1994). Entre 1969 e 1985, a difteria atingiu principalmente

crianças com idade igual ou inferior a 10 anos no Rio de Janeiro. No município de São Paulo, crianças com 7, 8 e 9 anos apresentaram susceptibilidade à doença de 31%, 14% e 5%, respectivamente, enquanto que indivíduos de 10 anos mostraram-se protegidos (KOOPMAN; CAMPBELL, 1975). Com a implantação da vacinação em massa pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) e adequação do calendário de vacinação este cenário apresentou mudanças significativas (**Tabela 1 e Figura 1**).

Os dados suprarreferidos indicam que se deve enfatizar a importância da aplicação de doses de reforço com o toxóide diftérico a fim de evitar decréscimos nos níveis de anticorpos da população (CAVUS et al., 2007, DINELLI et al., 2007).

MATTOS-GUARALDI e colaboradores (2001) descreveram a ocorrência de um caso de difteria, no ano de 1999, em paciente que declarou ter sido submetido ao esquema completo de imunização infantil e às doses de reforço dois anos antes. O quadro toxêmico iniciou-se após a participação do mesmo, durante cinco dias consecutivos, de reuniões no Rio de Janeiro com profissionais europeus. Subsequentemente ao isolamento, a amostra foi caracterizada como pertencente à subespécie *gravis*, toxinogênica e não fermentadora de sacarose, sendo esta a principal subespécie circulante na Europa e responsável pela maioria dos casos de difteria naquele mesmo período. Depois de implantado o programa de imunização na França, os casos clássicos de difteria praticamente desapareceram, passando a ser observados principalmente casos da doença em indivíduos que haviam retornado de viagens para países endêmicos, incluindo indivíduos vacinados e que receberam doses de reforço pouco tempo antes da doença (BONMARIN et al., 2009). É importante ressaltar que as condições imunológicas gerais do hospedeiro, a dose infectante e a virulência do clone bacteriano parecem ser fatores adicionais que influenciam na vulnerabilidade à difteria dos indivíduos vacinados (HOGG et al., 2009, POPOVIC et al., 2000).

1.2. *Corynebacterium ulcerans*

1.2.1. Aspectos microbiológicos

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo de bastonetes Gram positivos irregulares, de crescimento aeróbico, imóveis, não esporulados e catalase positivos. Foram descritas mais de sessenta espécies, sendo a maioria isolada de humanos e animais (KHAMIS et al., 2004).

A espécie *Corynebacterium ulcerans* foi descrita por Gilbert & Stewart em 1926 como não pertencente aos biotipos de *C. diphtheriae* após a caracterização de 31 amostras obtidas a partir de 1920. Os microrganismos, gelatinase-positivos e nitrato-positivos, incluídos nesta espécie foram capazes de causar lesões dermonecroticas em decorrência da produção de toxina solúvel diferente da toxina diftérica.

Além dos quadros de difteria clássica (respiratória e cutânea), *C. ulcerans* tem sido relacionado com quadros pulmonares diversos (SIEGEL et al., 1985, DESSAU et al., 1995, HOMMEZ et al., 1999, HATANAKA et al., 2003, NUREKI et al., 2007, MATTOS-GUARALDI et al., 2008), sinusite necrotizante (WELLINGHAUSEN et al., 2002), além de outros (SING et al., 2003).

A análise filogenética de seqüências do gene 16S rRNA permitiu identificar *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* como espécies distintas potencialmente produtoras de toxina diftérica (RIEGEL et al., 1995). *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* são microrganismos capazes de hidrolisar a uréia, o que os diferencia presuntivamente da espécie tipo do gênero, o *C. diphtheriae*.

1.2.2. Aspectos epidemiológicos

Inicialmente, os casos de faringite diftérica causada por *C. ulcerans* em humanos estavam geralmente relacionados a áreas rurais. *C. ulcerans* tem sido

isolado de gado bovino com quadros clínicos de mastite e de produtos lácteos, sugerindo que o consumo de leite e derivados poderia estar envolvido na transmissão do microrganismo. A descrição de um caso de infecção em indivíduo que relatou o hábito de consumir leite não fervido/pasteurizado e de um fazendeiro portador nasal assintomático do microrganismo revelou o potencial do *C. ulcerans* de circular entre hospedeiros humanos e animais, e de causar difteria de natureza zoonótica (HIGGS et al., 1967, BOSTOCK et al., 1984, HART, 1984, BARRETT, 1986, HOMMEZ et al., 1999).

Relatos de casos clínicos vêm apontando outros animais domésticos, além dos bovinos e caprinos, como sendo capazes de transmitir o microrganismo a hospedeiros humanos, inclusive cães e gatos. No Reino Unido, foram analisadas 81 amostras toxinogênicas de *C. ulcerans* de origens diversas. No período de 1986 a 2003, foram isoladas 50 amostras de humanos e sete amostras oriundas de gatos domésticos que apresentavam corrimento nasal bilateral. Os microrganismos isolados dos gatos eram pertencentes aos mesmos ribotipos de *C. ulcerans* isolados de humanos infectados, sugerindo a possibilidade de gatos serem capazes de atuar como reservatório de *C. ulcerans* (TAYLOR et al., 2002, DE ZOYSA et al., 2005).

Recentemente, houve casos relatados de pacientes humanos que não apresentavam fatores de risco associados às infecções por *C. ulcerans*, tais como consumo de leite cru ou ter contato com animais de fazenda provocando um aumento da preocupação sobre a transmissão de *C. ulcerans* entre pequenos animais e entre seres humanos (DEWINTER et al., 2005, DE ZOYZA et al., 2005, LARTIGUE et al., 2005, AARON et al., 2006, MATTOS-GUARALDI et al., 2008, SETO et al., 2008, TIWARI et al., 2008, KATSUKAWA et al., 2009).

Nos últimos anos a maior parte dos casos de difteria notificados na Europa (BONMARIN et al., 2009, HOGG et al., 2009, SCHUHEGGER et al., 2009, LEGGEETT et al., 2010), Japão (KATSUKAWA et al., 2009) e EUA (HALL et al., 2010) tem *C. ulcerans* como agente apresentando como reservatório inicial animais sejam eles domésticos ou não.

Em 2005 e 2006, dois casos de difteria causados por *C. ulcerans* foram descritos na França (LARTIGUE et al., 2005, AARON et al., 2006). Em ambos os casos, a principal característica foi que a fonte de infecção era o cão de estimação, enfatizando a natureza zoonótica de transmissão do microrganismo (AARON et al., 2006). Foi realizada a pesquisa de portadores/contactantes, não sendo isolado o

microrganismo. Mesmo assim, os contactantes foram tratados com administração de amoxicilina ou eritromicina, no caso de alergia ao primeiro antibiótico (LARTIGUE et al., 2005). A transmissão do microrganismo homem a homem, no entanto, ainda não foi bem documentada (BOSTOCK et al., 1984, HART, 1984, BARRET, 1986, MATTOS-GUARALDI et al., 2008, TIWARI et al., 2008).

O crescente número de casos de infecções por *C. ulcerans* em cães e gatos ocorridos nos últimos cinco anos ressalta a importância de se ampliar o conhecimento relativo aos aspectos epidemiológicos desta zoonose emergente (DE WINTER et al., 2005, DE ZOYSA et al. 2005, LARTIGUE et al., 2005, AARON et al. 2006, SETO et al., 2008, KATSUKAWA et al., 2009, SYKES et al., 2010).

Conforme apresentado na **Tabela 2**, além dos quadros de difteria clássica (respiratória e cutânea), amostras de *C. ulcerans* também têm sido relacionadas com outros quadros de infecção em humanos, tais como sinusite, tonsilite, faringite, pneumonia e peritonite. Um número crescente de casos de infecções pelo *C. ulcerans* ocorridos em diversas espécies de animais tem sido descrito na literatura internacional e está apresentado na **Tabela 3**.

Nos países em desenvolvimento o número de casos reportados é bastante reduzido, na América Latina temos casos descritos em humanos apenas no Brasil (MATTOS-GUARALDI et al., 2008) e em animais na Argentina (MORRIS et al., 2005). Além destes raros casos descritos na América Latina, não há registros na literatura disponível de isolamento de amostras de *C. ulcerans* na Índia, China, Oceania e todo o continente africano. Não podemos deixar de aventar a hipótese de ocorrer a circulação do patógeno pelos diferentes continentes e de que possa haver sub-notificação de casos, principalmente em países em desenvolvimento, pelo fato de não existir disponibilidade de redes de laboratórios habilitados para o isolamento e identificação da espécie. Além do Reino Unido, poucos são os países que apresentam rotinas laboratoriais estabelecidas e que exijam a notificação compulsória de infecções humanas pelo *C. ulcerans* e que contemple, também, o isolamento de amostras atoxinogênicas.

TABELA 2. Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* em humanos relatados na literatura internacional.

País/Ano/Referencia	Nº Casos /Sexo	Idade/ Vacinação infantil	Quadro Clínico	Exame de Material Clínico	Produção de toxina	Desfecho/Observações
Inglaterra/1984/ Bostock 1984	01/ M	Adulto/ND	Assintomático	Swab nasal	ND	Recuperado/ Vacas e amostras de leite positivas para <i>C. ulcerans</i>
Inglaterra/1984/ Hart 1984	01/ F	Adulto/ND	Faringite	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Vacas e amostras de leite positivas para <i>C. ulcerans</i>
Inglaterra/1984/ Hart 1984	01/M	Criança (12 anos)/ Sim	Assintomático	Swab orofaringe	Positiva	
Dinamarca/1987/ Pers 1987	01/ M	Criança (9 anos)/ Sim	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	ND
Dinamarca/1956- 1989/Nielsen 1991	02/ND	ND	ND	ND	Positiva	ND/ Clone idêntico ao da Suécia
Suíça/1990/ Gubler 1990	01/M	Adulto (63 anos) /ND	Difteria clássica com miocardite	Pseudomembrana	Negativa	ND
Inglaterra/1990/ Leek 1990	01/F	Adulto (73 anos) /ND	Difteria clássica	Pseudomembrana	Positiva	Óbito

ND – não determinado

TABELA 2 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* em humanos relatados na literatura internacional.

Inglaterra/1992/ Carpentier 1992	01/F	Adulto (44 anos)/ Sim	Faringite, disfagia e hemorragia	Biopsia tecido nasal necrosado	Positiva	Recuperado
Inglaterra/1994/ Kisely 1994	01/ F	Criança (9 anos)/ Sim	Faringite macular e rash cutâneo	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Visitou a fazenda duas semanas antes
Alemanha/1994/ Hust 1994	01/F	Adulto (42 anos)/Sim	Difteria clássica	Fragmento de pseudomembrana	Positiva	Recuperado/ Contactantes negativos
Dinamarca/1995/ Dessau 1995	01/M	Adulto (56 anos) /ND	Tosse e vários nódulos pulmonares	Histopatologia dos nódulos	Negativa	Recuperado
USA/1997/ CDC 1997	01/F	Adulto (54 anos) /ND	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Inglaterra/2000/ CDC 2000	03/F	ND	1 Difteria clássica; 2 infecções de garganta	Swab orofaringe	Todas Positivas	Óbito; recuperados/ Soroterapia; pesquisa de contactantes negativa; habitantes de área rural
Alemanha/2001/ Wagner 2001	01/F	Adulto (71anos)/ Sim	Lesões cutâneas na tíbia (10 meses)	Swab orofaringe e cutâneo	Positiva fraca	Recuperado
Alemanha/2002/ Wellinghausen 2002	01/M	Adulto (77 anos) /ND	Sinusite necrótica, febre, tosse e rinorréia	Secreção nasal	Positiva	Óbito/ Habitante de área rural; óbito de vaca com descarga nasal na semana anterior

ND – não determinado

TABELA 2 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* em humanos relatados na literatura internacional.

Suíça/2002/ Kaufmann 2002	01/F	Adulto (71 anos) / Sim e reforço na idade adulta	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Alemanha/2003/ Sing 2003	01/ M	Adulto (40 anos) /ND	Lesão cutânea	Swab cutâneo	Positiva	Recuperado
Holanda/2003/ Van Dam 2003	01/F	Adulto (58 anos) /ND	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Japão/2003/ Hatanaka 2003	01/F	Adulto (52 anos) /ND	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Óbito de gato com descarga nasal anterior a internação
Italia/2003/ Von Hunolstein 2003	01/F	Adulto (75 anos) /ND	Difteria clássica	ND	Positiva	Recuperado
França/2005/ Lartigue 2005	01/F	Adulto (47 anos) /Sim	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Cão com lesão labial crônica positiva para <i>C. ulcerans</i> ; pesquisa negativa de 88 contactantes
Canada/1999-2003/ Dewinter 2005	03/ND	ND	Lesões cutâneas e portador de cateter renal	Swab cutâneo e cateter	Positiva	ND

ND – não determinado

TABELA 2 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* em humanos relatados na literatura internacional.

França/2006/ Aaron 2006	01/F	Adulto (70 anos)/durante o tratamento	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Pesquisa negativa de 56 contactantes; cão portador assintomático (swab nasal)
Japão/2007/ Nureki 2007	01/M	Adulto (55 anos) /ND	Quadro pulmonar, tosse, febre e perda de peso	Biopsia tecido pulmonar	Positiva	Recuperado
Inglaterra/2007/ Elden 2007	01/M	Adulto (50 anos) / Sim	Faringite, laringite edor abdominal	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Pesquisa negativa de contactante
Brasil/2008/ Mattos-Guaraldi 2008	01/F	Adulto (80 anos) /ND	Lesão cutanea com pseudomembrana e pneumonia	Aspirado traqueal	Positiva	Óbito/ Habitante de região metropolitana
USA/2008/ Tiwari 2008	01/M	Adulto (77 anos) /ND	Difteria clássica com pseudomembranaem todo o trato respiratório	Swab orofaringe	Positiva	Óbito/ Habitante de área rural
USA/2008/ Tiwari 2008	01/F	Adulto (66 anos) /ND	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado/ Habitante de área rural
Japão/2001/ Seto 2008	01/F	Adulto (52 anos) /ND	Faringite	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Japão/2005/ Seto 2008	01/M	Adulto (57 anos) /ND	Febre e parotidite epidêmica – Caxumba	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado

ND – não determinado

TABELA 2 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* em humanos relatados na literatura internacional.

Japão/2005/ Seto 2008	01/M	Adulto (51 anos) /ND	Lesão pulmonar	Lesão Pulmonar	Positiva	Recuperado
Japão/2005/ Seto 2008	01/F	Adulto (58 anos) /ND	Difteria clássica	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Alemanha/2009/ Schuhegger 2009	01/F	Adulto (56 anos) / Vacinada em 1960 e em 1998	Difteria clássica e disfagia	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Inglaterra/2009/ Hogg 2009	01/F	Adulto (idoso) /ND	Sinais de difteria	Swab orofaringe e nasal	Positiva	Óbito/ Habitante de área rural
Inglaterra/2006/ Hart 2010	01/F	Adulto (idoso) /ND	Amigdalite	Swab orofaringe	Positiva	Óbito/ Dois cães positivos para <i>C. ulcerans</i>
Inglaterra/2010/ Taylor 2010	01/M	Adulto (20 anos) /ND	Tonsilite e dor de garganta	Swab orofaringe	Positiva	Recuperado
Japão/2010/ Komiya 2010	02/ND	ND	ND	Swab orofaringe	Positiva	ND
Japão/2010/ Kimura 2010	01/F	Adulto (55 anos) /ND	Dor abdominal e fluido abdominal turvo	Cultura do liquido peritonial	Negativa	Recuperado

ND – não determinado

TABELA 3. Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium diphtheriae* em animais relatados na literatura internacional.

Hospedeiro	País/Ano/Referência	Produção de Toxina	Quadro Clínico	Observações
<i>CASOS POR C. ULCERANS</i>				
Gato	Usa/2010/ Hall 2010	Negativa	Otite severa	Pesquisa de contactantes: 3 Gatos positivos e 1 humano negativo / <i>Corynebacterium belfanti</i>
Cavalo	Irlanda/2010/ Leggett 2010	Positiva	Lesão cutanea (8 meses)	Swab de pus positivo; Animal se recuperou Pesquisa negativa de contactante
Macaco	Usa/1972/ May 1972	ND	ND	
Macaco	Usa/1974/ Fox 1974	ND	Mastite	
Macaco	Romênia/1977/ Panaitescu 1977	ND	Dermatite granulosa	Total de 272 macacos examinados
Vacas	Inglaterra/1984/ Bostock 1984	ND	Portadores assintomáticos	Proprietário recuperado; animais pesquisados como contactantes
Vacas	Inglaterra/1984/ Hart 1984	Positiva	Portadores assintomáticos	Proprietário recuperado; animais pesquisados como contactantes
63 Esquilos	Canadá/1988/ Olson 1988	Positiva	Portadores assintomáticos	Do total de 350 esquilos pesquisados, 6 vieram a óbito e os 57 sobreviventes receberam antibioticoterapia
26 Macacos Rhesus	Usa/2000/ Bergin 2000	Negativa	Submetidos a implantes de pele cefálica	56% positivos em swabs cutaneos e 3% em swabs orofaríngeos

ND – não determinado

TABELA 3 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium diphtheriae* em animais relatados na literatura internacional.

Camelo	Espanha/ 2000/ Tejedor 2000	ND	Linfadenite caseosa	ND
2 Gatos	Escócia/ 2002/ Taylor 2002	Positiva	Descarga nasal	Swab nasal positivo; Pesquisa negativa de contactante
2 Lontras	Inglaterra/2002/ Foster 2002	Positivas	1 Achada morta	Isolados em tecido pulmonar; Amostras Idênticas
7 Gatos	Inglaterra (Entre 1986 e 2003)/De Zoysa 2005	Todas Positivas	Descarga nasal bilateral	Os animais se recuperaram; comparou os 7 isolados de gatos com 50 isolados humanos
Cão	França/2005/ Lartigue 2005	Positiva	Lesão labial crônica	Animal eutanasiado; swabs de lesão cutânea, tonsilas e nariz positivos
Cabra	Argentina/2005/ Morris 2005	ND	Andando em círculos e tique nervoso	Animal eutanasiado; colheita do abscesso cerebral e líquido
Cão	França/2006/ Aaron 2006	Positiva	Portador assintomático	Proprietário recuperado; cão pesquisado como contactante
2 Orcas	Japão/ 2004/ Seto 2008	Positivas	Pneumonia purulenta Fêmea apresentou perda de peso e febre	Óbito da fêmea; isolado em sangue e pulmão (em ambas); Macho dividia a piscina
Leoa	Japão/ 2008/ Seto 2008	Negativa	Sepse	Colhida no sangue junto com <i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus</i>

ND – não determinado

TABELA 3 (CONT.). Casos de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium diphtheriae* em animais relatados na literatura internacional.

Cão	Japão/ 2009/ Katsukawa 2009	Positiva	Portador assintomático	Colheita de swab orofaríngeo de 65 cães saudáveis
2 Cães	Inglaterra/2006/ Hart 2010	Positiva	Portadores assintomáticos	Óbito de proprietário; cães pesquisados como contactantes
Cão	Usa/ 2010/ Sykes 2010	Negativa	Broncopneumonia	Sem pesquisa de contactantes; 2 cepas diferentes
CASOS POR <i>C. DIPHTHERIAE</i>				
Gato	Usa/2010/ Hall 2010	Negativa	Otite severa	Pesquisa de contactantes: 3 Gatos positivos e 1 humano negativo / <i>Corynebacterium belfanti</i>
Cavalo	Irlanda/2010/ Leggett 2010	Positiva	Lesão cutanea (8 meses)	Swab de pus positivo; Animal se recuperou Pesquisa negativa de contactante

ND – não determinado

Ensaio de ribotipagem também têm sido realizados para determinar a relação genética (ribotipos) entre os microrganismos isolados desses animais e os relacionados com processos infecciosos em humanos. A análise molecular dos microrganismos através da técnica de ribotipagem também permitiu demonstrar que a amostra de *C. ulcerans* isolada de humanos na Itália era pertencente a um mesmo ribotipo encontrado em amostras isoladas na Inglaterra naquele mesmo período (VON HUNOLSTEIN et al., 2003).

Ainda não foram totalmente esclarecidas as causas que vêm contribuindo para o aumento do número de casos de infecção pelo *C. ulcerans* em humanos e animais domésticos (**Tabelas 2 e 3**). Uma vez que foram observados ribotipos predominantes relacionados com processos infecciosos em humanos e animais, é possível que algumas amostras de *C. ulcerans* estejam apresentando fatores de virulência adicionais decorrente de pressão seletiva, associado às condições socioeconômicas desfavoráveis, incluindo áreas de superpopulação predominada por condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Adicionalmente, em alguns países, tais como os Estados Unidos, o número de animais domésticos que vivem no interior dos lares, circulando em áreas tais como cozinhas e quartos de dormir tem sido bastante significativo (MARQUEZI, 2007), favorecendo o processo de transmissão de diversos agentes e zoonoses para os seres humanos, possivelmente também o *C. ulcerans* (LARTIGUE et al., 2005, AARON et al., 2006).

1.2.3. Fatores de virulência

Algumas amostras possuem a capacidade de produzir toxinas dermonecróticas e formação de pseudomembranas nas superfícies cutâneo-mucosas, o que lhes confere a capacidade de mimetizar quadros clássicos de difteria respiratória e cutânea (WAGNER et al., 2001, DEWINTER et al., 2005), além de quadros invasivos tais como síndromes clínicas no trato respiratório inferior, como pneumonia (SIEGEL; HAILE, 1985, HOMMEZ et al., 1999, HATANAKA et al., 2003) e nódulos pulmonares granulomatosas (DESSAU et al., 1995).

Segundo CARPENTIER e colaboradores (1992) o microrganismo pode produzir quadros clínicos diversos dependendo do tipo e quantidade de toxina secretada.

Diversos estudos têm investigado os mecanismos de patogenicidade, além da produção de toxina diftérica em amostras de *C. diphtheriae* (MATTOS-GUARALDI et al., 2000, COLOMBO et al., 2001, HIRATA Jr et al., 2002, MOREIRA et al., 2003, SOUZA et al., 2003, HIRATA Jr et al., 2004), entretanto, pouco tem sido documentado sobre os fatores de virulência de *C. ulcerans*.

Dentre alguns dos mecanismos de virulência descritos podemos destacar os lipídios tóxicos associados à parede celular que podem mediar a resistência bacteriana ao ataque dos fagócitos (HARD, 1975). À semelhança do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* é capaz de produzir uma exotoxina do tipo fosfolipase D (PLD), que atua como uma esfingomielinase, sendo capaz de aumentar localmente a permeabilidade vascular contribuindo para disseminação do patógeno nos tecidos do hospedeiro (HODGSON et al., 1992). Atualmente a PLD é o fator de virulência mais importante observado durante infecção por *C. pseudotuberculosis* (MCNAMARA et al., 1995, BERGIN et al., 2000, MATTOS-GUARALDI et al., 2008).

A frequente ocorrência de sangramento nasal durante infecções por *C. ulcerans* em seres humanos já foi explicada pelos efeitos da toxina (WELLINGHAUSEN et al., 2002).

A ocorrência de necrose e ulceração da mucosa foi atribuída também à produção de TD e PLD. As lesões de pele que mimetizam a difteria cutânea típica (WAGNER et al., 2001) ou da árvore traqueobrônquica coberta por uma pseudomembrana (VAN DAM et al., 2003), hemorragia (CARPENTIER et al., 1992, WELLINGHAUSEN et al., 2002) e linfonodos cervicais com a morte celular por apoptose foram também explicados como efeitos da TD produzida pelo *C. ulcerans* (LEEK et al., 1990). Infecções por *C. ulcerans* podem produzir graves síndromes clínicas no trato respiratório inferior (NUREKI, 2007), ocasionalmente associados com sinais de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) com coagulação intravascular disseminada (DEWINTER et al., 2005).

Sinais de faringotraqueobronquite pseudomembranosa e miocardite também foram observadas em casos de difteria nos pacientes idosos causada por cepas

produtoras de toxina específica do *C. ulcerans* não produtoras de TD (GUBLER et al., 1990)

A preocupação de que o *C. ulcerans* poderia apresentar o potencial de emergir como patógeno capaz de albergar o bacteriófago codificador da toxina diftérica e, portanto, causar quadros de difteria clássica não é recente. Estudos demonstraram que alguns bacteriófagos teriam seletividade sobre *C. ulcerans* não induzindo a produção de TD (HENRIKSEN, 1955). Contudo, também foi constatada a capacidade do bacteriófago β infectar amostras de *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, constituindo risco para o surgimento de quadros de difteria causados por tais espécies (SING et al., 2003; AARON et al., 2006; SCHUHEGGER et al., 2009). A variabilidade na capacidade de produção de toxina diftérica entre as amostras de *C. ulcerans* já foi constatada (WONG; GROOMAN, 1984, GROMAN et al., 1984), apesar da maioria das amostras isoladas de quadros clínicos em humanos ser capaz de produzir a toxina diftérica (CDC, 1997, KAUFMANN, 2002, DEWINTER et al., 2005, LARTIGUE et al., 2005).

Tanto nos países industrializados, quanto nos países em desenvolvimento, têm sido observadas amostras de *C. ulcerans* capazes de produzir exotoxina apresentando características genóticas diferentes da toxina produzida pelo *C. diphtheriae* (VERTIEV et al., 1981, SING et al., 2005, CASSIDAY et al., 2008, MATTOS-GUARALDI et al., 2008).

Amostras de *C. ulcerans* já foram isoladas de quadros toxêmicos, apesar da produção de toxina não ter sido comprovada através dos ensaios específicos e rápidos (PCR) para a produção de toxina diftérica, sugerindo variabilidade na toxina produzida por *C. ulcerans*. Foram observadas variações na sequência nucleotídica entre o gene *tox* do *C. diphtheriae* e de algumas amostras de *C. ulcerans* (SING et al., 2003). Resultados atípicos também foram evidenciados após o desenvolvimento de reações de amplificação pela PCR em tempo real (CASSIDAY et al., 2008). Estes fatos podem contribuir para que os indivíduos vacinados com toxóide diftérico ou submetidos à soroterapia não apresentem proteção total contra as infecções causadas pelo *C. ulcerans*.

Algumas amostras isoladas de pacientes apresentando quadro de infecção extrafaringeal apresentaram diferenças nas sequências da toxina diftérica, predominantemente nos domínios de translocação e de aderência. Os sobrenadantes de culturas dessas amostras apresentaram potencial toxigenico

muito menor do que os sobrenadantes de culturas de *C. diphtheriae*. Estes achados estimularam o desenvolvimento de um ensaio de PCR específico para a toxina diftérica produzida por este grupo de amostras de *C. ulcerans* (SING et al., 2003) diferente do utilizado para *C. diphtheriae* (PALLEN et al., 1994).

1.2.4. Aspectos clínicos

De modo geral, as infecções diftéricas causadas pelo *C. ulcerans* têm sido relacionadas com pacientes que não receberam dose-reforço de toxóide diftérico, resultados negativos na pesquisa de portadores/contactantes e fonte de contaminação indeterminada (VAN DAM et al., 2003).

Microrganismos pertencentes à espécie *C. ulcerans* vem sendo motivo crescente de preocupação das autoridades em Saúde Pública em diversos países industrializados, incluindo a Inglaterra (ELDEN et al., 2007), França (AARON et al., 2006), Alemanha (SING et al., 2005), Holanda (VAN DAM et al., 2003), Itália (VON HUNOLSTEIN et al., 2003), Suíça (GUBLER et al., 1990; KAUFMANN et al., 2002), Dinamarca (NIELSEN et al., 1991), Japão (HATANAKA et al., 2003), Canadá (DEWINTER et al., 2005) e Estados Unidos (CDC, 1997, CDC, 2000, TIWARI et al., 2008).

Além dos quadros de difteria clássica (respiratória e cutânea) o *C. ulcerans* também tem sido relacionado com diversos quadros de infecção em humanos, conforme apresentado na **Tabela 2**. Dentre os casos relatados na literatura onde foi possível determinar o sexo dos pacientes, foi observada uma predominância em indivíduos do sexo feminino (n=24; 65%). Vale destacar que a maioria das infecções animais pelo *C. ulcerans* foi observada em fêmeas e relacionada com quadros de mastites (**Tabela 3**).

Casos clínicos relacionados ao *C. ulcerans* ocorridos em outras espécies de animais têm sido descritos na literatura: macacos (MAY, 1972, FOX; FROST, 1974, PANAITESCU et al., 1977, BERGIN et al., 2000), esquilos (OLSON et al., 1988), camelos (TEJEDOR et al., 2000), lontras (FOSTER et al., 2002) e caprinos (MORRIS et al., 2005) (**Tabela 3**).

A transmissão homem-a-homem do *C. ulcerans* ainda não foi concretamente reportada, mas vários pesquisadores recomendam o isolamento de pacientes infectados (KISELY et al., 1994, CDC, 1997). A rápida identificação dos portadores poderia ser otimizada com o uso de um novo meio de cultura contendo fosfomicina, que poderia ser preparado em qualquer laboratório de rotina (LARTIGUE et al., 2005).

No primeiro e único caso clínico de infecção humana por *C. Ulcerans* reportado no Brasil (MATTOS-GUARALDI et al., 2008), o histórico de vacinação da paciente era desconhecido bem como a fonte de infecção. Foi observado que alguns dias após a morte da paciente e conseqüentemente após a exposição ao patógeno, um dos profissionais de saúde envolvido no caso apresentou um quadro de faringite e iniciou imediatamente antibioticoterapia com eritromicina antes da coleta de material para cultura e identificação. Muito embora a cultura tenha apresentado resultado negativo, o paciente apresentou sinais de miocardite detectados após exames cardiológicos clínicos incluindo ecocardiografias e repetidos eletrocardiogramas.

1.2.5. Situação atual no Brasil

Em Agosto de 2010 o Ministério da Saúde emitiu através de Nota Técnica (BRASIL, 2010) um alerta sobre a situação da difteria no Brasil. Este documento informa que foram observadas mudanças no perfil clínico-epidemiológico da doença, tais como ausência de pseudomembranas e desvio de faixa etária, e que também têm sido descritos casos de difteria causados por cepas de *C. ulcerans* produtoras de toxina. Outros pontos a serem destacados são a recomendação de que em caso de difteria confirmada por infecção pela espécie *C. ulcerans* devem ser adotadas as mesmas medidas de controle preconizadas para a espécie *C. diphtheriae*; profissionais da área de saúde devem notificar, tratar e monitorar todos os casos suspeitos de difteria com isolamento de cepas não produtoras de toxina. Informações atuais indicam a circulação de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* em nosso ambiente e que em algumas regiões do país somente 30% dos adultos estão completamente protegidos contra a ação da toxina diftérica (DAMASCO et al., 2005).

A semelhança do ocorrido com o *C. diphtheriae* na última década, a possibilidade de surtos de difteria ocasionados pela dispersão de clones de *C. ulcerans* capazes de infectar humanos e serem produtoras de toxina diftérica, diferente daquela utilizada nas preparações vacinais utilizada nos programas mundiais de imunização contra a difteria, não deve ser negligenciada.

Segundo Pesavento (2007) vivemos uma era de reemergência de várias doenças onde algumas hipóteses buscam explicar esta ocorrência: status sanitário da população, migrações, ambientação dos patógenos às novas condições, fatores ambientais entre outros. Segundo o autor, abrigos animais apresentariam várias condições predisponentes para este fenômeno: stress, imunossupressão, superpopulação, alta exposição, alta rotatividade animal, nutrição e uso indiscriminado de antibióticos tornando-se um fator de risco para população humana e animal.

No Brasil foi descrito recentemente um único caso de infecção fatal em humanos causada por *C. ulcerans* (MATTOS-GUARALDI et al., 2008). A paciente, idosa, que morava em um bairro de classe-média alta (Laranjeiras) na região metropolitana do Rio de Janeiro, apresentou diversas lesões cutâneas recobertas por pseudomembranas em ambos os membros inferiores e morreu em decorrência de complicação cardio-respiratória, mesmo após antibioticoterapia e soroterapia. O microrganismo, produtor de exotoxina que apresentava diferenças na subunidade A da molécula, foi isolado do trato respiratório inferior do paciente e mostrou-se resistente aos antimicrobianos penicilina G (MIC 0,19 mg/l) e clindamicina (MIC 1,5 mg/l). Variações nos perfis de sensibilidade já haviam sido anteriormente observadas por outros autores (COYLE et al., 1979, GLADIN et al., 1999). Do mesmo modo que ocorrido nos Estados Unidos (TIWARI et al., 2008), a origem da infecção não foi esclarecida. A apresentação de tais casos destaca a importância do diagnóstico e pronto-tratamento da difteria e de medidas de prevenção, sobretudo em indivíduos que não foram submetidos às doses de reforço com a vacina contendo o toxóide diftérico. A escassez de dados epidemiológicos provavelmente deve estar relacionada ao fato de os clínicos e os microbiologistas não estarem atentos para a possibilidade de infecção por estes microrganismos nessas regiões, aliado ao desconhecimento de aspectos clínicos e microbiológicos de processos infecciosos causados pelo *C. ulcerans* e ausência de procedimentos de rotina que permitam o isolamento e identificação do patógeno nos laboratórios clínicos.

Em países em desenvolvimento onde a incidência de difteria permanece relativamente alta e a cobertura vacinal continua insuficiente, o suporte laboratorial deve ser implementado visto as deficiências recorrentes neste segmento. Na **Figura 2** temos a diagramação de um de esquema de triagem acurado, rápido, econômico e de fácil execução, capaz de permitir a realização do diagnóstico presuntivo de casos de difteria causados tanto pelo *C. ulcerans* quanto pelo *C. diphtheriae* na maioria dos laboratórios brasileiros.

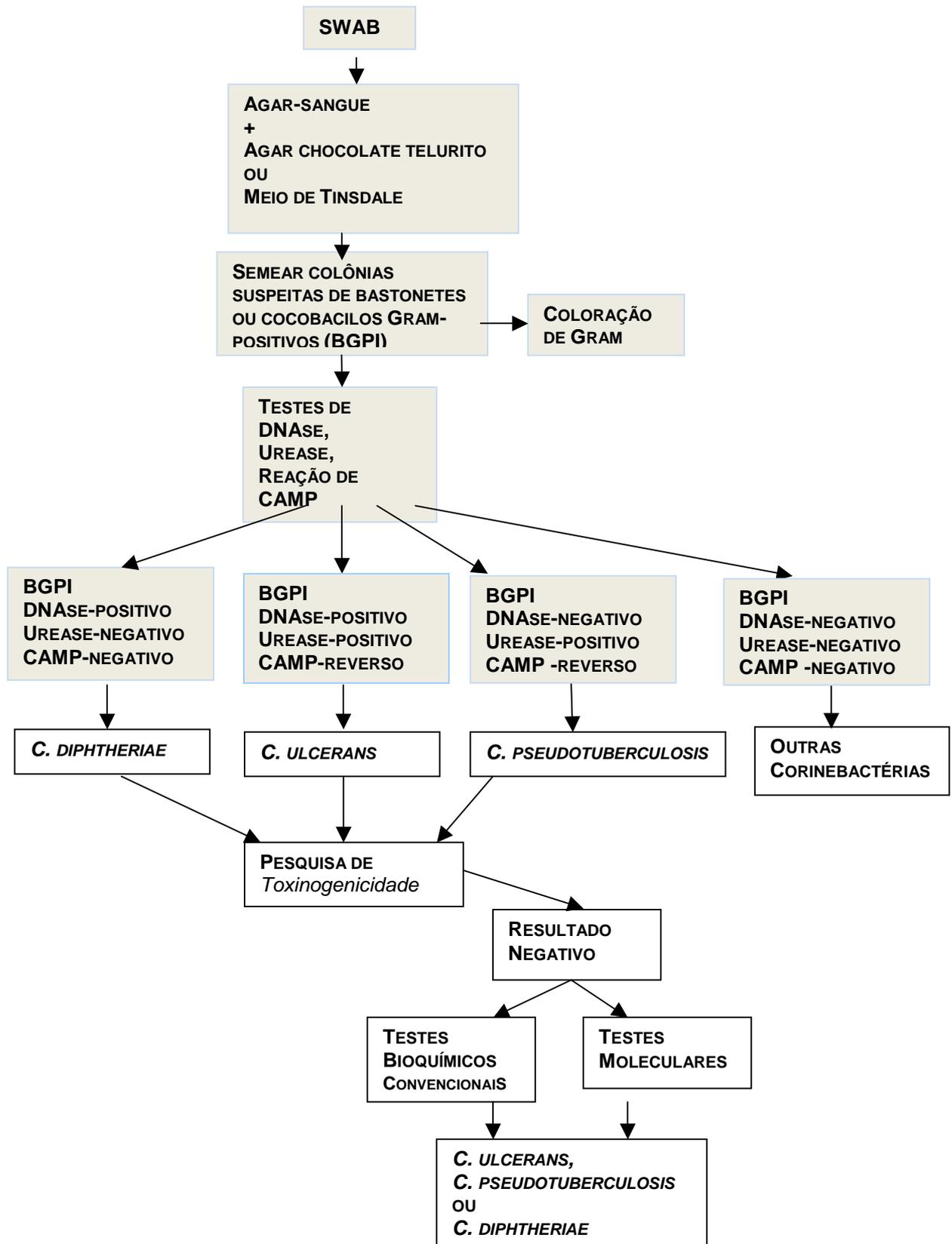


FIGURA 2. Esquema de triagem para amostras de bastonetes Gram positivos irregulares (MATTOS-GUARALDI et al., 2010).

A já comprovada circulação de *C. ulcerans* em vários países seja ela em animais ou em humanos (**Figura 3**), somada ao recente caso descrito no Brasil, nos leva a considerar a hipótese de sua livre circulação também no território nacional.

A aderência bacteriana e invasão das células hospedeiras foram demonstradas como passos significativos na patogênese da difteria e casos de infecção por *C. diphtheriae* sistêmica (HIRATA Jr et al., 2002). Como as interações entre bactérias e células hospedeiras determinam o desfecho da maioria das doenças infecciosas quaisquer informações que contribuam aumentando o conhecimento deste assunto serão de grande importância na patogenia deste bacilo.



Figura 3. Distribuição mundial de casos notificados de infecções pelo *Corynebacterium ulcerans*. Incidência em humanos (estrelas) e em animais (triângulos).

1.3. RELAÇÃO COM A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Mudanças na epidemiologia de difteria ocorrem em todo o mundo. Apesar da vacinação em massa, a difteria continua endêmica em várias partes do mundo, incluindo África, Índia, trópicos e a América Latina, incluindo Brasil. Embora a difteria seja considerada em declínio no Brasil, a doença permanece endêmica na maioria dos estados nas duas últimas décadas com taxa de letalidade entre 5% a 10%. Alta taxa de letalidade, grande proporção de pacientes com complicações e ocorrência em jovens e adultos tem caracterizado estas epidemias.

A ocorrência de difteria entre vacinados, o aumento dos casos de artrite e endocardite causados por clones invasivos atoxinogênicos (não produtores de toxina) responsáveis por alta letalidade de difteria respiratória no Brasil apontam para necessidade de um maior conhecimento sobre estes fatores microbianos.

Não há informação disponível quanto à cobertura vacinal de jovens e adultos no Brasil (FUNASA, 2002). Dados atuais indicam a circulação de *C. diphtheriae* em nossa população e mostram que somente 30% dos adultos estão completamente protegidos.

A vacinação com o toxóide diftérico protege apenas contra os efeitos da toxina e não contra a infecção propriamente dita tornando necessários novos estudos sobre as características destes clones epidêmicos atoxinogênicos e a real proteção conferida pela vacina disponível atualmente corroborando ou não com a aplicação em massa desta vacina.

Neste contexto, o INCQS, com sua missão de contribuir para a promoção da saúde, prevenção de doenças além de atuar como referência nacional no controle da qualidade de produtos (vacinas), ambientes (cepas circulantes na população) e serviços vinculados à vigilância sanitária (Programa Nacional de Imunizações/controle da qualidade de produção e controle da vacina contra difteria), desempenha importante papel em todo este processo irreversível em todo o mundo e com praticamente todas as doenças imunopreveníveis.

2. OBJETIVOS GERAIS

Além dos quadros de difteria clássica, *C. diphtheriae* toxinogênico ou atoxinogênico tem sido isolado de diversos processos infecciosos invasivos. Aliado a este fato, há a escassez de trabalhos na literatura que procuram investigar *in vivo* os fatores que influenciam o estabelecimento e/ou a disseminação de amostras potencialmente invasoras de *C. diphtheriae*. Associado a estes fatos encontramos na literatura a descrição de inúmeros casos de um patógeno potencialmente perigoso para a população o *C. ulcerans*, que se apresenta como um desafio para os órgãos de Saúde Pública brasileiros que somente o incluíram na rotina dos esquemas de isolamento e identificação recentemente. Portanto o presente estudo tem como objetivos gerais investigar processos invasivos desencadeados por amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* potencialmente invasivas utilizando modelos experimentais em animais. Além de realizar a pesquisa de *C. ulcerans* em populações de caninos e felinos mantidos em instituição destinada ao abrigo de animais domésticos localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A *Corynebacterium diphtheriae*

- Padronizar modelo experimental de infecção utilizando cobaias infectadas pela via intracardíaca para observação do desenvolvimento de endocardite bacteriana;
- Padronizar modelo experimental de infecção utilizando camundongos infectados por via endovenosa para observação do desenvolvimento de artrite séptica;
- Padronizar modelo experimental de infecção utilizando camundongos infectados por via intranasal para observação do desenvolvimento de pneumonias;
- Investigar o potencial artritogênico de diversas cepas de *C. diphtheriae* através do modelo de artrite em camundongos;

- Monitorar a viabilidade bacteriana na corrente sanguínea, pulmões, articulações, rins, baço e tecido cardíaco em diferentes intervalos de tempo em animais imunizados ou não pelo toxóide diftérico;
- Avaliar a produção sérica de citocinas incluindo TNF- α e IL-6 decorrentes do processo infeccioso;
- Avaliar a participação do complexo proteico de superfície 67-72p no estabelecimento de processos invasivos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS A *Corynebacterium ulcerans*

- Analisar as condições clínicas da população de animais integrantes do estudo;
- Pesquisar a presença do patógeno em sítios anatômicos diversos;
- Caracterizar fenotipicamente os microrganismos isolados dos animais através de testes bioquímicos convencionais e de sistema semi-automatizado;
- Pesquisar o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na clínica;
- Avaliar a capacidade de produção de enzimas (DNase), fosfolipase D (PLD D) e TD dos isolados clínicos;
- Caracterizar os genes (*rpoB*) e espécie-específicos (16S rRNA) e de virulência (*PLD*) através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Tratar os animais infectados e pesquisar os contactantes animais e equipe técnica do abrigo.
- Padronizar modelo experimental de infecção utilizando camundongos infectados por via endovenosa para observação do desenvolvimento de artrite séptica;
- Investigar o potencial artritogênico de diversas cepas de *C. ulcerans* através do modelo de artrite em camundongos;
- Monitorar a viabilidade bacteriana na corrente sanguínea, pulmões, articulações, rins, baço e tecido cardíaco em diferentes intervalos de tempo em animais;

- Avaliar a produção sérica de citocinas incluindo TNF- α e IL-6 decorrentes do processo infeccioso;

-Avaliar a virulencia de cada uma das cepas através da determinação da Dose Letal 50% em camundongos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO *C. diphtheriae*

3.1.1. Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) sob nº L-034/07.

3.1.2. Origem, estocagem e cultivo das amostras bacterianas

Os microrganismos estudados, apresentados na **Tabela 4** abaixo, foram previamente identificados por testes bioquímicos convencionais e submetidos a testes de produção de toxina utilizando metodologias descritas anteriormente (CLARIDGE; SPRIEGEL, 1995, NAKAO et al., 1996, FUNKE et al., 1997, NAKAO; POPOVIC, 1997). Encontram-se estocadas em meio GC-glicerol 20% à temperatura de -20 °C no Laboratório de Difteria e Corinebacterioses, Disciplina de Microbiologia e Imunologia, FCM/UERJ. Foram utilizados em diversas etapas do estudo a toxina diftérica purificada e soro antidiftérico (Instituto Butantan/Serum Institute of Copenhagen), além do toxóide diftérico produzido pelo Instituto Butantan e disponibilizado pelo PNI (Programa Nacional de Imunização) à população. Para a realização dos experimentos as amostras bacterianas foram inicialmente cultivadas em meio Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Labs.) suplementado com 5% de Soro

Fetal Bovino (SFB, Difco), a 37 °C por 48 horas (HIRATA Jr et al., 2002). A amostra da cepa vacinal Park-Williams 8 é a utilizada pelo produtor nacional, Instituto Butantan, para fabricação do toxóide diftérico.

Tabela 4. Origem e características biológicas de todas as amostras de *Corynebacterium diphtheriae* estudadas.

Número da Amostra/País	Subespécie	Sítio de Isolamento	Quadro Clínico	Metabolismo de Sacarose	Presença toxina diftérica		
					Gene <i>tox</i> ¹	IDR ²	Células Vero ³
<i>C. diphtheriae</i>							
ATCC27010/EUA	<i>mitis</i>	Orofaringe	Difteria	-	-	-	-
ATCC27012/EUA	<i>mitis</i>	Orofaringe	Difteria	-	+	+	+
PW-8	<i>mitis</i>	Orofaringe	Cepa vacinal	-	+	+	+
CDC-E8392/EUA	<i>mitis</i>	Orofaringe	Difteria	-	+	+	+
241/Brasil	<i>mitis</i>	Orofaringe	Difteria	+	+	+	+
402/Brasil	<i>belfanti</i>	Pulmão	Pneumonia	-	-	-	-
HCO1/Brasil	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite	+	-*	+	-
HCO2/1999/Brasil	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite	+	-*	+	-
HCO3	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite + Artrite	+	-*	+	-
HCO4	<i>gravis</i>	Sangue	Sepse + Endocardite	-	-*	+	-

ATCC, American Type Cell Culture; HC, hemocultura; Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ; ¹ Técnica de PCR utilizando os iniciadores preconizados por Nakao; Popovic1997; * Resultados positivos apenas quando utilizados os iniciadores 5 e/ou 7 preconizados por Nakao et al., 1996; IDR² - ensaio de imunodifusão radial; ³ Ensaio padrão-ouro de toxicidade em monocamadas de células Vero.

3.1.3. Origem dos animais e modelos experimentais

Foram utilizados cobaias (*Cavea porcellus*), machos e fêmeas, com 500 g +/- 10%, nos ensaios de endocardite experimental e camundongos da linhagem Swiss

Webster, machos e fêmeas, com 20 g +/- 10%, nos ensaios de artrite experimental e modelo intranasal, provenientes do Centro de Criação Animal (CECAL/Fiocruz). Foram realizados experimentos envolvendo animais imunizados e não imunizados pelo toxóide diftérico do Instituto Butantan com metade da dose total humana (0,75 mL) conforme descrito em BRASIL (1996).

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inoxidável (30 cm x 19 cm x 12 cm) e cama de maravalha de pinus e aclimatados por 24 horas antes do início do experimento.

Todos os animais receberam água e ração comercial para ratos (Nuvilab-Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no Setor de Animais de Laboratório (SAL)/INCQS com os seguintes controles ambientais: temperatura (20 +/- 2 °C), umidade relativa do ar em aproximadamente 70% e ciclo claro-escuro constante de 7 às 19 horas. As trocas de cama e água foram realizadas três vezes por semana e a ração substituída semanalmente.

Todos os procedimentos envolvendo animais de laboratório seguiram o Procedimento Operacional Padronizado “Boas Práticas de Experimentação Animal” nº 65.3340.022 (MANUAL DA QUALIDADE, 2010).

3.1.4. Modelo intranasal

Os experimentos foram adaptados de metodologia previamente descrita por GUIZO e colaboradores (1999). Camundongos, imunizados ou não pelo toxóide diftérico, foram levemente anestesiados pelo éter e com o auxílio de uma pipeta eppendorf foram instilados 30 µL de uma suspensão contendo 10⁸ bactérias por mL. A partir desta infecção (desafio) grupos de três animais foram sacrificados em diferentes períodos (1 dia, 7 dias e 15 dias), foi realizada a ablação do pulmão direito, maceração e diluição deste material para posterior plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para observarmos uma cinética bacteriana e possíveis fatores que interfiram no processo.

Outros órgãos também foram investigados para observarmos se a infecção se restringiria apenas ao tecido respiratório.

3.1.5. Endocardite experimental em cobaias

Os experimentos foram adaptados de metodologia previamente descrita por QUÉ e colaboradores (2005). Vegetações aórticas estéreis foram produzidas conforme descrito por HERAIEF e colaboradores (1982), através da cateterização de grupos de 5 cobaias, 24 a 48 horas antes do desafio pela via intracardíaca ou endovenosa com amostras de suspensão de *C. diphtheriae* na concentração de 10^8 bactérias por animal. Grupos de animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo pós-infecção (0, 7 e 15 dias) de acordo com PULITI e colaboradores (2006). O número de viáveis (UFC/mL) foi estabelecido a partir dos cultivos em meio Trypticase Soy Agar (TSA) de material diluído proveniente de válvulas cardíacas, baço, sangue, rins e articulações.

3.1.6. Artrite experimental em camundongos

Grupos de camundongos foram infectados por via endovenosa pela veia da cauda com suspensão bacteriana de 4×10^8 bactérias por mL. O número de viáveis (UFC/mL) foi estabelecido a partir dos cultivos em meio TSA de material diluído proveniente do líquido sinovial de articulação escolhida através de sinais clínicos (inchaço, dor, edema etc) (PULITI et al., 2006).

3.1.7. Avaliação da participação do complexo proteico de superfície 67-72p no estabelecimento de processos invasivos

Nesta etapa, foi utilizado um complexo proteico da parede de *C. diphtheriae* 67-72p, previamente purificado. Grupos de camundongos foram inoculados via subcutânea com diferentes concentrações do complexo proteico purificado e após 28 dias foi efetuado um desafio com suspensão bacteriana e toxina diftérica de

referência no intuito de avaliar a capacidade desta estrutura de parede de proteger os animais contra a infecção e contra os sintomas desencadeados pela toxina diftérica através deste modelo (PULITI et al., 2006).

3.1.8. Dosagem de citocinas

Para verificar o envolvimento de *C. diphtheriae* no modelo murino de artrite a produção sistêmica de IL-6 e TNF- α foi investigada em diferentes intervalos de tempo após a infecção com as diferentes cepas estudadas.

Os níveis de concentração de Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) foram medidos em amostras de soros de grupos de 5 camundongos através do kit comercial de ELISA adquirido junto a R&D Systems e utilizado conforme recomendações do fabricante.

Os resultados são expressos em picogramas por mililitro de soro. Os níveis de detecção dos ensaios realizados são de 0,975 pgmL⁻¹ a 500 pgmL⁻¹ para IL-6 e de 7,8125 pgmL⁻¹ a 4000 pgmL⁻¹ para TNF- α .

3.1.9. Análise estatística

A avaliação dos dados obtidos entre animais de um mesmo experimento e entre experimentos em datas diferentes foi trabalhada pela análise de Variância e de Covariância onde $P > 0,05$; teste t de Student para variáveis independentes, $P < 0,05$.

3.2. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO *Corynebacterium ulcerans*

Parte da metodologia e dos resultados referentes a essa etapa do trabalho estão presentes em um artigo científico recentemente publicado, que se encontra anexado como parte integrante da Tese (Vide ítem 4.2.1.1.).

3.2.1. Considerações éticas

Na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ, este projeto encontra-se protocolado sob nº P-0462/08.

3.2.2. Origem, estocagem e cultivo das amostras bacterianas

Os microrganismos estudados, apresentados na **Tabela 5** abaixo, foram previamente identificados por testes bioquímicos convencionais e submetidos a testes de produção de toxina utilizando metodologias descritas anteriormente (CLARIDGE; SPRIEGEL, 1995, NAKAO et al., 1996, FUNKE et al., 1997, NAKAO; POPOVIC, 1997). Encontram-se estocadas em meio GC-glicerol 20% à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Difteria e Corinebacterioses, Disciplina de Microbiologia e Imunologia, FCM/UERJ. Para a realização dos experimentos as amostras bacterianas foram inicialmente cultivadas em meio Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Labs.) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Difco), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (HIRATA Jr et al., 2002).

Tabela 5. Origem e características biológicas das amostras de *Corynebacterium ulcerans* utilizadas no estudo

Cepa/País	Origem	Apresentação Clínica	Metabolismo de Sacarose	Produção de toxina diftérica		
				Gene <i>tox</i> ¹	IDR ²	Vero Cells ³
CDC KC 279/USA	Pulmão	Pneumonia	-	+	+	+
809/2000/Brazil	Pulmão	Pneumonia	-	-	+	-
BR-AD22/2010/Brazil	Narina	Assintomático	-	-	-	-

¹ Técnica de PCR utilizando os iniciadores preconizados por Nakao; Popovic, 1997;

*Resultados positivos apenas quando utilizados os iniciadores 5 e/ou 7 preconizados por Nakao et al., 1996; IDR² -ensaio de imunodifusão radial; ³ ensaio padrão-ouro de toxicidade em monocamadas de células Vero.

3.2.3. Artrite experimental em camundongos

Grupos de camundongos foram infectados por via endovenosa pela veia da cauda com suspensão bacteriana de 4×10^8 bactérias por mL. O número de viáveis (UFC/mL) foi estabelecido a partir dos cultivos em meio TSA de material diluído proveniente do líquido sinovial de articulação escolhida através de sinais clínicos (inchaço, dor, edema etc) (PULITI et al., 2006).

3.2.4. Viabilidade de *Corynebacterium ulcerans* nos órgãos e tecidos

Infecções em sangue, rins, baço e articulações em camundongos infectados pelo *C. ulcerans* foram determinadas pela presença de microrganismos em diferentes momentos após a inoculação do microrganismo. Amostras de sangue foram obtidas por sangramento do seio retro-orbital. Rins, articulações e baço foram removidos assepticamente e homogeneizados com 3mL do meio estéril RPMI 1640. Todas as articulações do punho e tornozelo de cada animal foram retiradas *in toto*

homogeneizados em RPMI 1640. Após homogeneização, as amostras de tecidos foram semeadas em triplicata em placas de ágar sangue para observar o crescimento de microrganismos.

3.2.5. Dosagem de Citocinas

Para verificar seu envolvimento no modelo murino de artrite induzida pelo *C. ulcerans* a produção sistêmica de IL-6 e TNF- α foi investigada em diferentes intervalos de tempo após a infecção com as diferentes cepas descritas na **Tabela 5**.

Os níveis de concentração de IL-6 e TNF- α foram medidos em amostras de soros de grupos de 5 camundongos através do kit comercial de ELISA adquirido junto a R&D Systems e utilizado conforme recomendações do fabricante.

Os resultados são expressos em picogramas por mililitro de soro. Os níveis de detecção dos ensaios realizados são de 0,975 pgmL⁻¹ a 500 pgmL⁻¹ para IL-6 e de 7,8125 pgmL⁻¹ a 4000 pgmL⁻¹ para TNF- α .

3.2.6. Avaliação histológica

Os camundongos foram examinados em diferentes momentos após a infecção para caracterização histopatológica de artrite. Articulações afetadas (uma por animal) foram removidas assepticamente, fixadas em formol a 10% v/v por 24 horas e descalcificadas em EDTA em tampão fosfato 0,1 M por 7 dias. Foram então desidratadas, embebidas em parafina, seccionadas a 5 μ m e coradas com hematoxilina e eosina e, em seguida, descalcificadas em ácido tricloroacético 5% v/v por 7 dias, desidratadas, embebidas em parafina, seccionadas em 3-4 μ m e coradas com hematoxilina e eosina.

Articulações (três por pata) foram examinadas para sinovite (definida como a espessura da membrana sinovial de mais de duas camadas de células), extensão do infiltrado (presença de células inflamatórias no subcutâneo e/ou tecidos

periarticulares), exudato (presença de células inflamatórias na cavidade articular), lesão da cartilagem, erosão óssea e perda da arquitetura usual.

A severidade da artrite foi classificada como leve (leve hipertrofia sinovial, infiltrado mínimo), moderada (moderada hipertrofia sinovial, presença de infiltrado, exudato mínimo, a integridade da arquitetura usual) e grave (acentuada hipertrofia sinovial, marcante presença de infiltrado/exsudato, erosão da cartilagem e osso e alterações na arquitetura articular usual).

3.2.7. Análise estatística

A avaliação dos dados obtidos entre animais de um mesmo experimento e entre experimentos em datas diferentes foi realizada pela análise de Variância e de Covariância onde $P > 0,05$; teste t de Student para variáveis independentes, $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS REFERENTES AO *Corynebacterium diphtheriae*

4.1.1. Modelo intranasal

Grupos de camundongos foram inoculados com diferentes cepas de *C. diphtheriae* através da instilação de 30 µL de uma suspensão contendo 10⁸ bactérias por mL.

A partir desta infecção (desafio) grupos de três animais foram sacrificados em diferentes períodos (1 dia, 7 dias e 15 dias), sendo realizada a ablação do pulmão direito, maceração e diluição deste material para posterior plaqueamento. Apenas a cepa 402/Brasil conseguiu colonizar o trato respiratório inferior (pulmões), o que permitiu a sua recuperação a partir dos macerados pulmonares. O dado interessante é que esta é a única cepa dentre as utilizadas que foi isolada de um quadro de pneumonia o que sugere uma adaptação natural prévia desta cepa ao trato respiratório inferior. Mesmo nesta cepa não foi possível a recuperação do microrganismo em outros órgãos alvo tais como baço, supra-renais, fígado e sangue, sugerindo que a infecção tenha ficado restrita ao trato respiratório.

4.1.2. Endocardite experimental em cobaias

Devido a nossa experiência na técnica de punção cardíaca em cobaias para obtenção de soro e devido à complexidade da técnica descrita por QUÉ e colaboradores (2005), buscamos realizar algumas adaptações.

Segundo a literatura consultada, no desenvolvimento de endocardite bacteriana é necessária a pré-existência de uma lesão cardíaca ao nível de endotélio, onde os microrganismos oriundos de um processo de bacteremia possam se fixar, multiplicar e em nosso caso liberar suas toxinas. Na grande maioria dos

casos de endocardites descritos, esta lesão se dá nas válvulas cardíacas sob forma congênita, mais comumente ou em pacientes transplantados.

Foram feitas tentativas de promoção destas lesões através de sucessivas punções cardíacas diárias em grupos de cobaias onde ao invés de puncionarmos o sangue inoculávamos, via intracardíaca, 1mL de uma suspensão bacteriana contendo 10^8 bactérias por mL. Alguns grupos chegaram a passar por 7 processos de inoculação intracardíaca (1 por dia) e foram, então, observados por até 60 dias no intuito de observarmos quaisquer sinais clínicos de endocardite. Neste ponto encontramos outro obstáculo importante, pois mesmo em humanos o diagnóstico de endocardite bacteriana é bastante complexo. Normalmente o processo de diagnóstico se inicia com o surgimento de uma febre baixa e persistente acompanhada de uma difícil detecção da presença de microrganismo na hemocultura. A confirmação se dá com a realização de exames de imagens com a necessária observação da presença de vegetações e/ou destruição da anatomia cardíaca, em particular de suas válvulas.

Todas as etapas descritas acima foram executadas em nossos animais experimentados, através da observação de qualquer alteração clínica, medição da temperatura basal realizada diariamente durante 60 dias, coletas de sangue semanais para posterior realização de hemoculturas e ao final do experimento necropsia dos animais para observação da presença de possíveis lesões cardíacas, sendo que todas as observações apresentaram resultados negativos.

4.1.3. Artrite experimental em camundongos

4.1.3.1. *Seleção de linhagem de camundongos a ser utilizada na pesquisa de atividade artrítogênica*

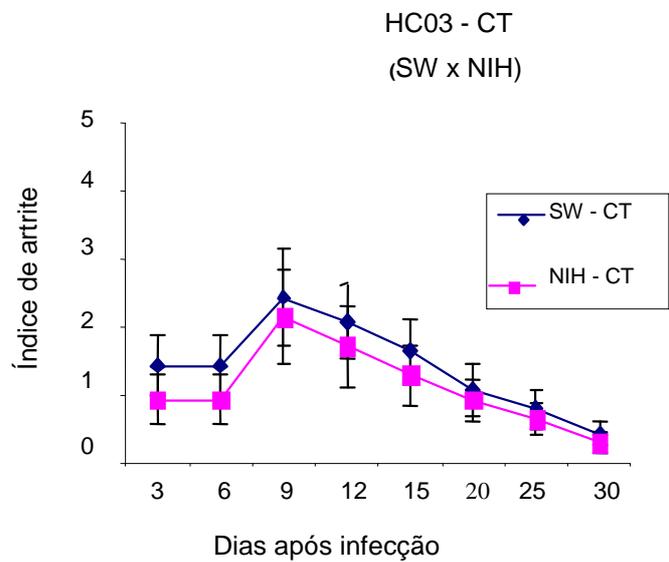
Utilizamos a Cepa HC03 em três grupos distintos (controle (CT), vacinados pelo toxóide diftérico (VAC) e tratados com 500 UI de soro antidiftérico via intraperitonal (SAD)) das duas linhagens de camundongos suíços albinos mais comumente utilizadas no controle de qualidade de vacinas bacterianas: Swiss

Webster e NIH (**Figura 4**). Dentre os três grupos comparados apenas os grupos controle (CT) apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($P = 0,3308$).

A linhagem Swiss Webster (SW) apresentou sinais clínicos de artrite mais evidentes que a NIH, a exceção do grupo tratado pelo SAD, que aliado a seu menor custo de produção, fez com que esta fosse a eleita para realização dos experimentos posteriores.

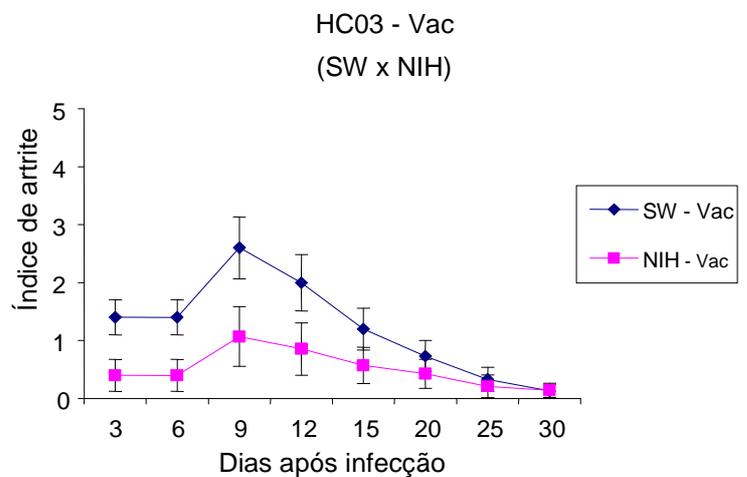
HCC03 - CT	SW	NIH
SW	1	0,3308
NIH	0,3308	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p < 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.



HC03 - Vac	SW	NIH
SW	1	0,0465
NIH	0,0465	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p < 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.



HC03 – Sad	SW	NIH
SW	1	0,0446
NIH	0,0446	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p < 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

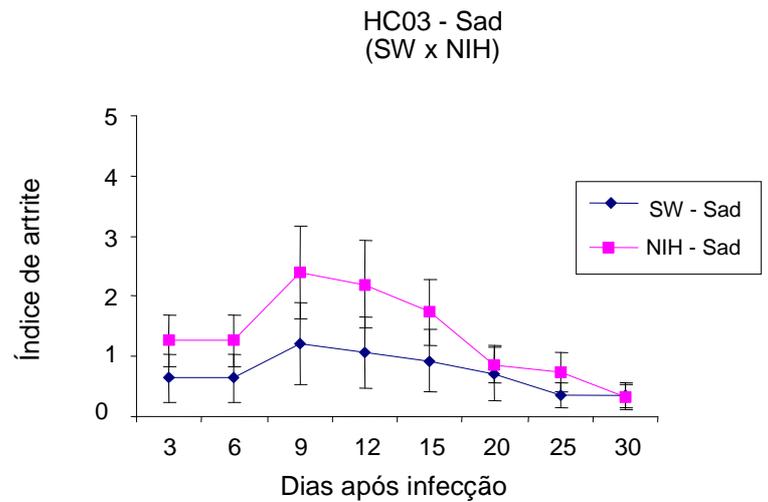


Figura 4. Comparação entre duas linhagens de camundongos (SW e NIH) quanto à capacidade de apresentar sinais clínicos de artrite. Os animais foram separados em 3 grupos (CT = grupo controle, sem tratamento; VAC = vacinados pelo toxóide diftérico e SAD = tratados com soro antidiftérico

4.1.3.2. Atividade artrítogênica em camundongos Swiss Webster das cepas homólogas ATCC27010 (Atoxinogênica) e ATCC27012 (Toxinogênica) e da cepa vacinal PW8

As cepas ATCC 27010 e ATCC 27012 não apresentaram, em nosso modelo, perfis artrítogênicos estatisticamente semelhantes (**Figura 5**). A cepa ATCC 27010 (Atoxinogênica) demonstrou uma maior capacidade de induzir sinais clínicos de artrite em camundongos, sugerindo que a capacidade de produção de toxina diftérica pouco ou nada interfere neste modelo de infecção invasiva.

Observou-se que cepa PW8, nesta etapa, é a que possui um maior potencial de causar sinais clínicos de artrite séptica enfatizando a relação de cepa dependente deste processo, e que apesar de apresentar grande capacidade de produzir toxina diftérica, e por isso ser a cepa de eleição para fabricação de toxóide, ainda assim não consegue desencadear processos artrítogênicos relevantes.

PW8 / 27010 / 27012
(Swiss Webster)

CEPAS	27010	27012	PW8
27010	1	0,0112	0,4544
27012	0,0112	1	0,2072
PW8	0,4544	0,2072	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p < 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata n de 15 camundongos por grupo.

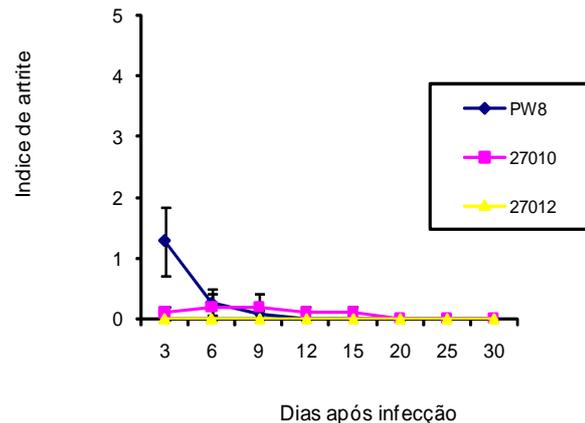


Figura 5. Perfis artritogênicos das cepas padrão ATCC27010/EUA (Atoxinogênico), ATCC27012/EUA (Toxinogênico) e PW8 (Vacinal) em camundongos Swiss Webster

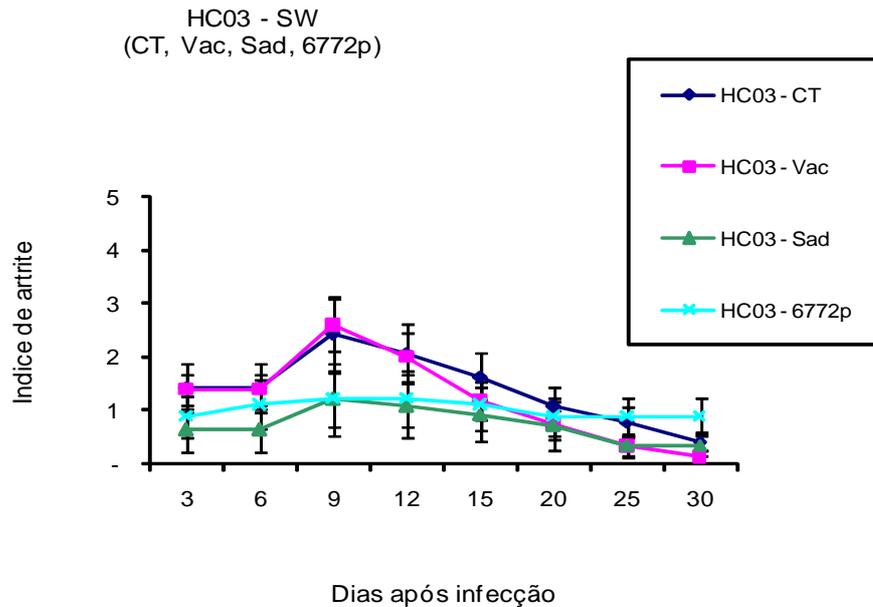
4.1.3.3. Comparação dos diferentes tratamentos no desenvolvimento de artrite séptica em grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster desafiados com a cepa de Corynebacterium diphtheriae HC03

Utilizamos a cepa HC03 em quatro grupos distintos (controle (CT), vacinados pelo toxóide diftérico (VAC), tratados com 500 UI de soro antidiftérico via intraperitoneal (SAD) e imunizados com o complexo proteico de membrana 67-72p (PTN 67-72p) de camundongos da linhagem Swiss Webster (**Figura 6**).

Os grupos controle e vacinados pelo toxóide diftérico apresentaram perfis artritogênicos estatisticamente semelhantes e o mesmo aconteceu com relação ao grupo imunizado previamente com o PTN 67-72p.

O grupo tratado pelo soro antidiftérico e o grupo vacinado com o PTN 67-72p apresentaram índices mais baixos aparentemente demonstrando sua capacidade de

interferir neste modelo de infecção invasiva. Estes dados sugerem que os tratamentos recebidos pelos grupos de camundongos tanto em relação a vacinação com o PTN 67-72p quanto ao emprego do soro antidiftérico foram capazes de interferir, seja no estabelecimento (no caso do grupo SAD), como na minimização dos sinais clínicos ao longo dos trinta dias do ensaio (no caso do PTN 67-72p).



GRUPOS	CT	Vac	Sad	6772-p
CT	1	0,6260	0,0207	0,1342
Vac	0,6260	1	0,1549	0,5437
Sad	0,0207	0,1549	1	0,0283
67-72p	0,1342	0,5437	0,0283	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

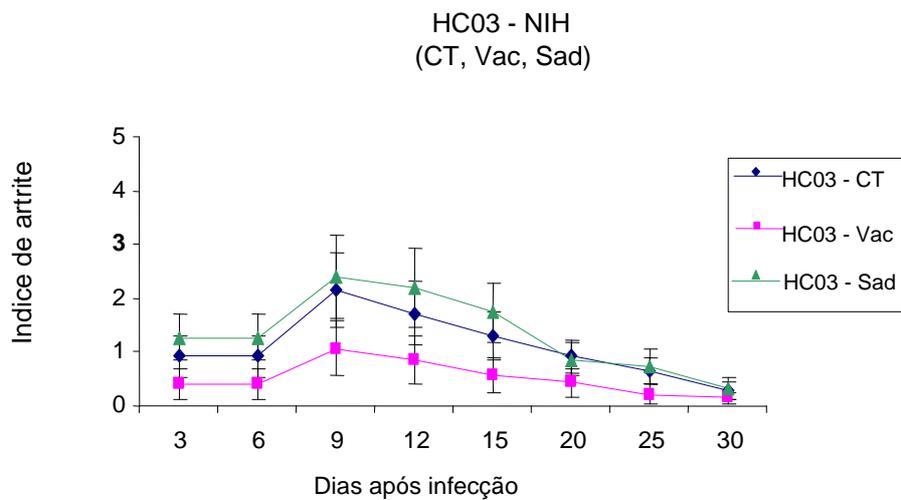
Figura 6. Comparação da atividade artritogênica da cepa HC03 em diferentes grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster tratados previamente

4.1.3.4. Avaliação da influência de diferentes tratamentos no desenvolvimento de artrite séptica em grupos de camundongos da linhagem NIH desafiados com a cepa de Corynebacterium diphtheriae HC03

Utilizamos a cepa HC03 em três grupos distintos (controle (CT), vacinados pelo toxóide diftérico (VAC) e tratados com 500 UI de soro antidiftérico via intraperitoneal (SAD) de camundongos da linhagem NIH (**Figura 7**).

Os grupos controle e tratados pelo SAD apresentaram perfis artritogênicos estatisticamente semelhantes ($p=0,4393$).

O grupo vacinado com o toxóide diftérico apresentou índices mais baixos aparentemente demonstrando sua capacidade de interferir neste modelo de infecção invasiva, nesta linhagem de camundongos NIH.



Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p>0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaio realizado em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

GRUPOS	CT	Vac	Sad
CT	1	0,0309	0,4393
Vac	0,0309	1	0,0104
Sad	0,4393	0,0104	1

Figura 7. Comparação da atividade artritogênica da cepa HC03 em diferentes grupos de camundongos da linhagem NIH tratados previamente

4.1.3.5. Avaliação da imunização com o complexo protéico de membrana de 67-72p quanto ao estabelecimento de artrite séptica por Corynebacterium diphtheriae

O denominado PTN 67-72p é um complexo de proteínas de membrana de *C. diphtheriae* que é extraído especificamente da Cepa CDC-E8392/EUA e que tem sido estudada por nosso grupo, daí nosso interesse em observar sua capacidade imunogênica quanto ao desencadeamento do processo invasivo em nosso modelo de artrite experimental.

Utilizamos a cepa CDC-E8392/EUA em dois grupos distintos de camundongos SW (controle (CT) e vacinados com o PTN 67-72p).

Nesta etapa, foi utilizada o PTN 67-72p adsorvido com adjuvante completo de Freund (v/v). Grupos de camundongos da linhagem SW receberam 2 imunizações via sub-cutânea com intervalo de 15 dias. O complexo protéico foi preparado em uma concentração de 0,5 mg/mL e inoculado 0,5 mL por camundongo a cada imunização. Duas semanas após a segunda imunização os animais foram desafiados via endovenosa com uma suspensão contendo 10^8 bactérias por mL. Um grupo foi desafiado com a cepa HC03, outro grupo foi desafiado com a cepa de onde usualmente é extraído este complexo protéico, a cepa CDC-E8392/EUA e um terceiro grupo foi apenas desafiado com a cepa CDC-E8392/EUA servindo de controle nesta etapa da experimentação. Os resultados estão sumarizados nas **Figuras 6 e 8**.

O grupo controle apresentou perfil artrítogênico estatisticamente inferior ao do grupo tratado com a PTN 67-72p. Nesta etapa, como a cepa utilizada apresentou baixo potencial artrítogênico, aparentemente o complexo protéico parece favorecer o surgimento de sinais clínicos de artrite neste modelo de infecção invasiva.

GRUPOS	CT	67-72p
CT	1	0,0005
67-72p	0,0005	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

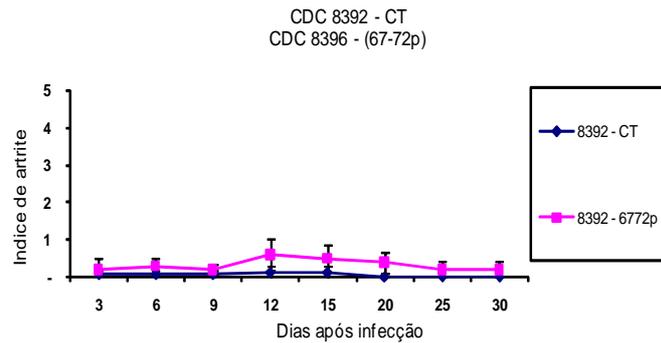


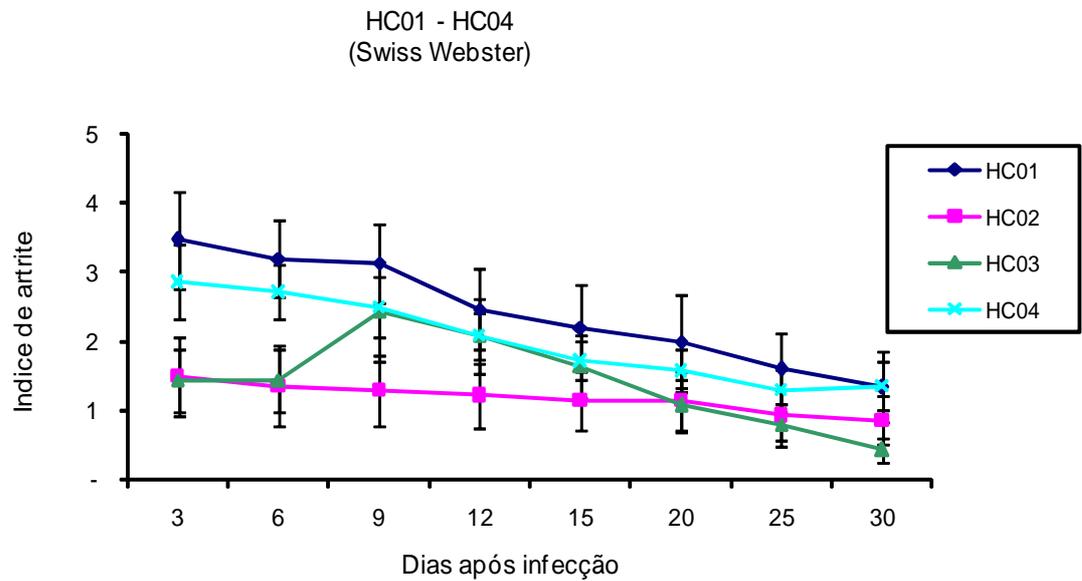
Figura 8. Avaliação da imunização com o complexo protéico 67-72p quanto ao estabelecimento de artrite séptica pela cepa de *C. diphtheriae* CDC-E8392

4.1.3.6. Avaliação dos perfis de atividade artritogênica de cepas atoxinogênicas invasoras de *Corynebacterium diphtheriae*

Utilizamos quatro cepas de *C. diphtheriae* (HCO1/Brasil, HCO2/1999/Brasil, HCO3, HCO4) oriundas de isolados humanos na promoção de sinais clínicos de artrite em camundongos SW.

As quatro cepas apresentaram perfis distintos de atividade artritogênica, onde a cepa HCO1/Brasil demonstrou uma maior capacidade invasiva neste modelo de experimentação animal (**Figura 9**).

As cepas HCO1/Brasil e HCO4 apresentaram perfis estatisticamente semelhantes em um patamar mais elevado de atividade artritogênica. Em um nível menor de potencial temos as cepas HCO2/1999/Brasil e HCO3 igualmente com perfis estatisticamente semelhantes ($p = 0,3708$).



Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

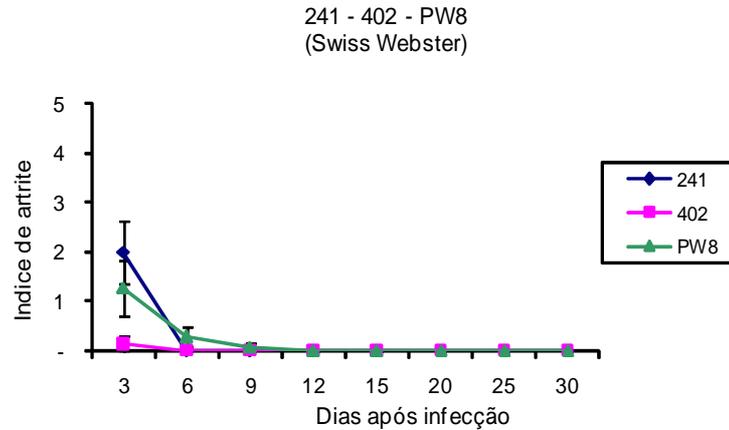
CEPAS	HC01	HC02	HC03	HC04
HC01	1	0,0007	0,0135	0,2785
HC02	0,0007	1	0,3708	0,0025
HC03	0,0135	0,3708	1	0,0689
HC04	0,2785	0,0025	0,0689	1

Figura 9. Perfis artríticos das cepas invasoras de *C. diphtheriae* HC01, HC02, HC03 e HC04

4.1.3.7. Avaliação dos perfis de atividade artrítica de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* 241/Brasil, 402/Brasil e a cepa vacinal PW8

Utilizamos três cepas de *C. diphtheriae* oriundas de isolados humanos na promoção de sinais clínicos de artrite em camundongos SW.

As três cepas apresentaram perfis semelhantes estatisticamente de atividade artrítica, sendo que após o nono dia pós-infecção já não havia qualquer sinal clínico de artrite nos camundongos que foram experimentados neste ensaio. A cepa 241/Brasil foi a que pelo menos inicialmente apresentou maior potencial artrítico (**Figura 10**).



CEPAS	241	402	PW8
241	1	0,3588	0,9012
402	0,3588	1	0,2324
PW8	0,9012	0,2324	1

Valores de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. Ensaios realizados em triplicata e n de 15 camundongos por grupo.

Figura 10. Perfis artritogênicos das cepas de *C. diphtheriae* 241/Brasil, 402/Brasil e PW8

4.1.3.8. Porcentagem de animais que apresentaram sinais clínicos de artrite após infecção por cada cepa de *Corynebacterium diphtheriae* e de *Corynebacterium ulcerans* utilizadas no estudo

Grupos de camundongos da linhagem SW, machos e fêmeas, de 18 a 22 gramas foram infectados com 0,5 mL via endovenosa com uma suspensão de 4×10^8 bactérias por mL de diferentes cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. A figura apresenta os diferentes percentuais de camundongos atingidos, ou seja, que apresentaram quaisquer sinais clínicos de artrite, de acordo com cada cepa utilizada enfatizando os diferentes potenciais artritogênicos demonstrados (**Figura 11**). Fica, mais uma vez destacada a aparente falta de interferência da capacidade de produzir toxinas no processo de desenvolvimento de artrite séptica neste modelo animal. A cepa toxinogênica de *C. diphtheriae* ATCC27012 apresentou o pior perfil artritogênico dentre as cepas estudadas semelhante ao isolado canino BR-AD22. As

cepas de *C. diphtheriae* ditas invasoras, que produzem uma TD atípica (vide **Tabela 4**) e em quantidades variáveis, foram as mais expressivas em associação com as cepas de *C. ulcerans* 809 e CDC-KC279.

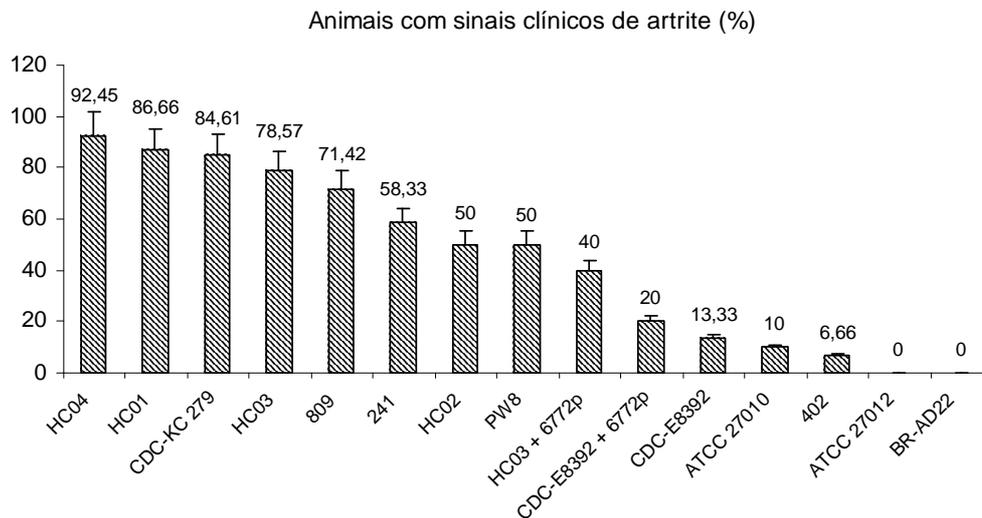


Figura 11. Porcentagem de animais inoculados e que apresentaram sinais clínicos de artrite

4.1.3.9. Potencial artritogênico de cada cepa utilizada no estudo

Foi determinado o nível médio de artrite desencadeada por cada cepa de *C. diphtheriae* utilizada no estudo. O valor foi obtido através da soma dos índices apresentados por cada camundongo infectado dividido pelo número total de camundongos utilizados em cada grupo (**Figura 12**).

Aqui podemos observar que, sob as mesmas condições experimentais, cepas diferentes de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentaram capacidades de promover infecções invasivas completamente distintas.

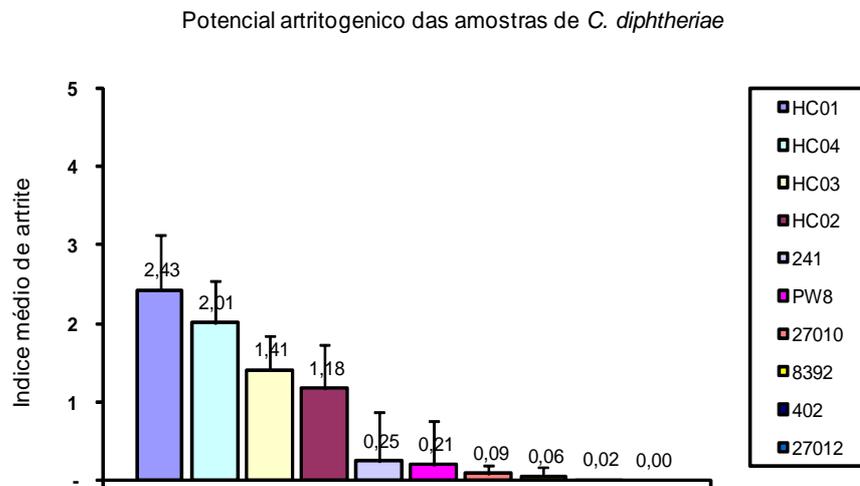


Figura 12. Potencial artritogênico médio das amostras de *C. diphtheriae* utilizadas no estudo

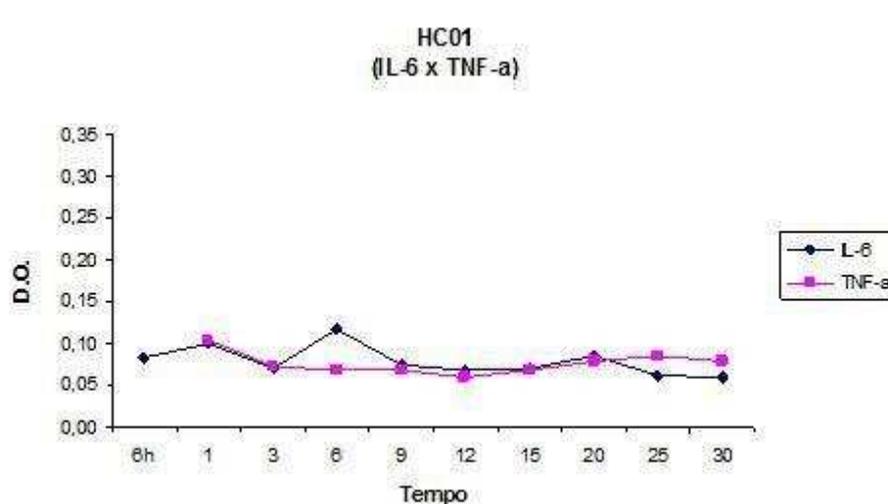
4.1.4. Dosagem de citocinas

Todos os grupos de camundongos que foram desafiados com as diferentes cepas utilizadas em nosso estudo, bem como os grupos que receberam tratamentos prévios (vacina, soro, PTN 67-72p) também foram submetidos, concomitantemente, a sangrias pelo plexo orbital nos dias 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 (alguns experimentos foram também coletados no tempo 6h). Os soros provenientes destas sangrias foram aliquoteados e estocados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a realização das dosagens de citocinas.

Na **Figura 13** podemos observar o perfil de liberação de TNF- α e IL-6 nos diferentes grupos de animais decorrentes da utilização das cepas HCO1, HCO2 e HCO3. Com relação à cepa HC01 o nível sérico de IL-6 apresenta nível máximo em torno do sexto dia após a infecção. Verificamos que esta cepa tem seu potencial artritogênico máximo precocemente no terceiro dia, assim como as outras cepas de *C. diphtheriae* isoladas de quadros de infecções invasivas em humanos denominadas HC. Com relação à cepa HC02 o nível máximo de expressão sérica

em camundongos se dá no 15º dia. O nível médio de produção de IL-6 se apresenta nos mesmos patamares aos observados para a cepa HC01. Pode ser observado que os níveis médios de expressão de IL-6 em soro de grupos de camundongos da linhagem SW desafiados com a cepa HC03 são superiores aos apresentados pelas cepas HC01 e HC02. Neste caso temos também outra diferença com o pico de produção se dando precocemente as seis horas pós infecção. Ao observarmos o perfil artritogênico das cepas chamadas invasoras de *C. diphtheriae* (**Figura 10**) podemos observar que as cepas HC01, HC02 e HC03 apresentam uma tendência de elevação no intervalo entre o sexto e o nono dia após desafio o que pode explicar a permanência dos sinais clínicos de artrite após o trigésimo dia pós-infecção (**Figura 9**).

O perfil de liberação se manteve muito semelhante em relação a todas as cepas usadas, a exceção pela liberação acentuada de IL-6 relacionada a cepa HCO3 observada apenas nos primeiros dias de coleta.



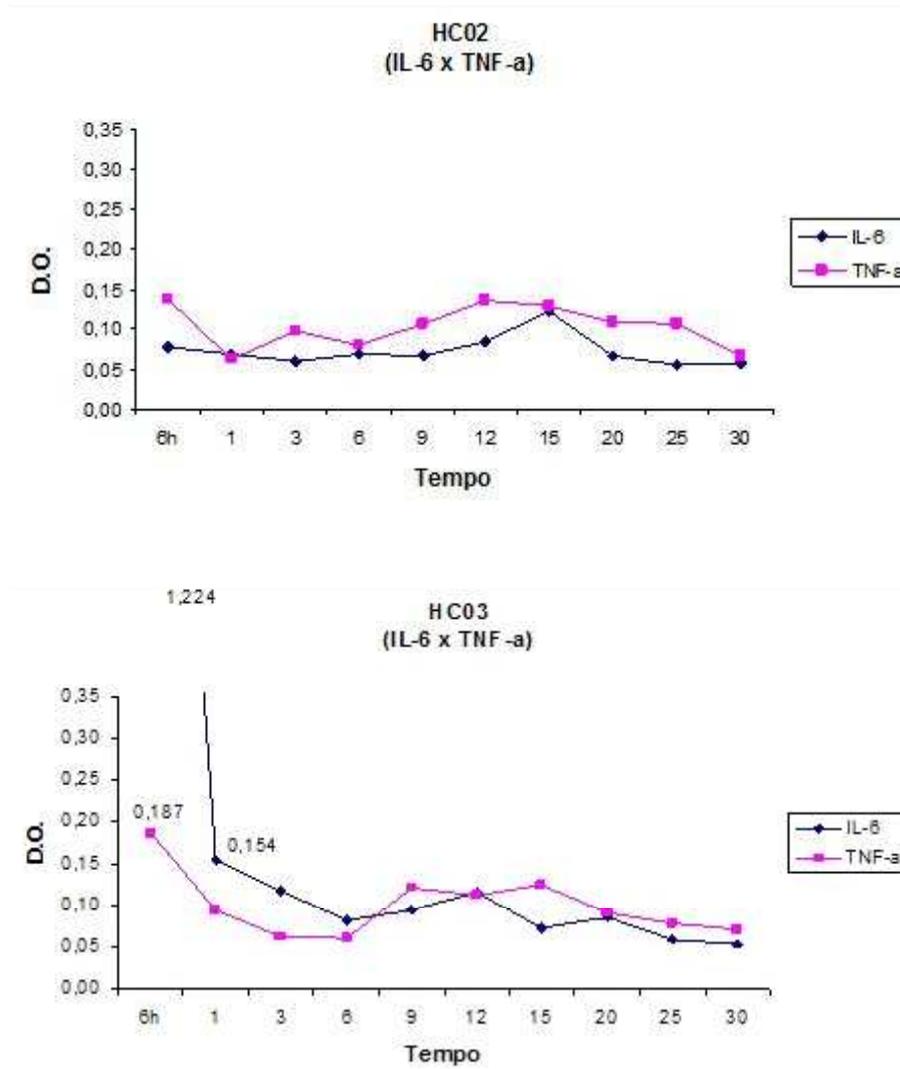


FIGURA 13. Dosagem de IL-6 x TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster desafiados com as cepas HC01, HC02 e HC03 de *C. diphtheriae*. Amostras de soro colhidas em 6h e nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 pós-desafio

Na **Figura 14** é comparado o perfil de liberação da citocina IL-6 da cepa CDC-E8392/EUA com as anteriormente testadas na **Figura 13** (HCO1, HCO2 e HCO3). A cepa CDC-E8392/EUA apresentou um pico de liberação aos 12 dias e curva com tendência de alta após o dia 15.

A cepa CDC-E8392/EUA, diferentemente das anteriores, apresentou (**Figura 14**) dois picos de expressão dos níveis séricos de IL-6, no primeiro e no décimo segundo dias após infecção. Nos gráficos de artrite correspondente a esta cepa (**Figuras 6 e 8**) também observamos discreta elevação entre o décimo segundo e vigésimo dia após desafio.

Semelhantemente ao que ocorre com os níveis séricos de IL-6 e índice de artrite expressos pela cepa CDC-E8392/EUA, podemos verificar que também ocorre no décimo segundo dia uma elevação da expressão de TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens SW (**Figura 15**).

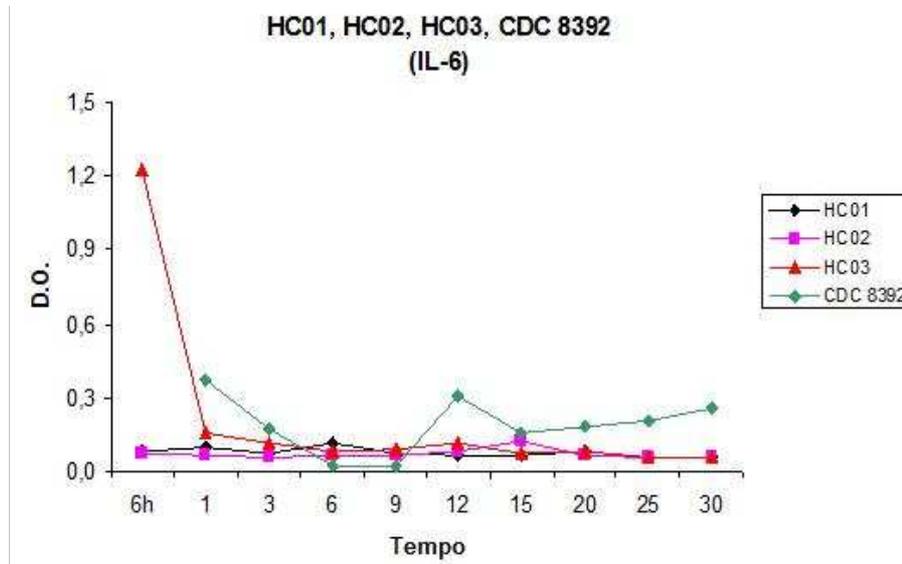


FIGURA 14. Dosagem de IL-6 em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster desafiados com a cepa CDC-E8392/EUA, HC01, HC02 e HC03 de *C. diphtheriae*. Amostras de soro colhidas em 6h e nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 pós-desafio.

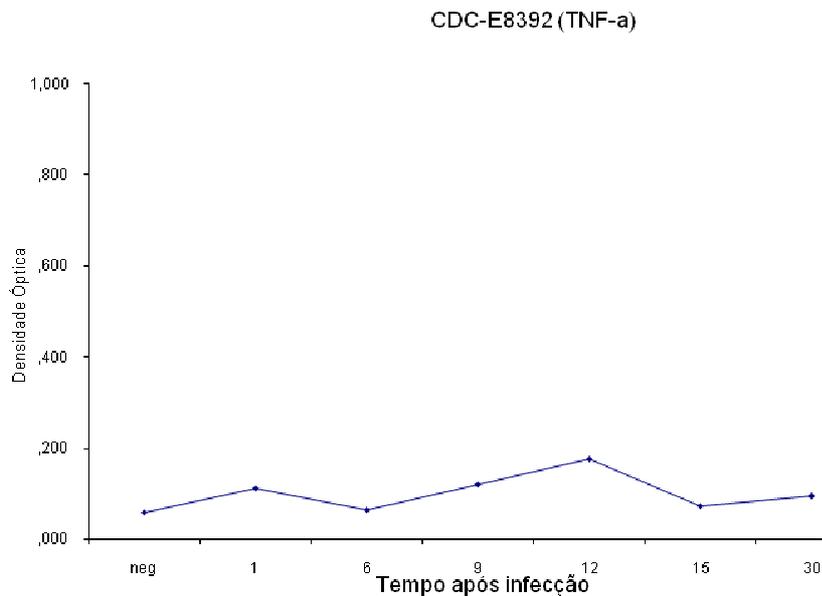


FIGURA 15. Dosagem de TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster desafiados com a cepa CDC-E8392 de *C. diphtheriae*. Amostras de soro colhidas em 6h e nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 pós-desafio

A **FIGURA 16** apresenta o perfil de liberação de IL-6 dos 3 diferentes grupos de camundongos que sofreram pré-tratamento (SAD, VAC e CT) e foram desafiados pela cepa HC03. A curva apresenta alguns picos de liberação no grupo de animais tratados pelo soro diftérico e pelo toxóide diftérico que ainda precisam ser confirmados. Em relação ao TNF- α , usando-se o mesmo tratamento anterior e a cepa HC03, não foram observadas variações quanto à liberação da citocina entre os grupos em estudo (**FIGURA 17**).

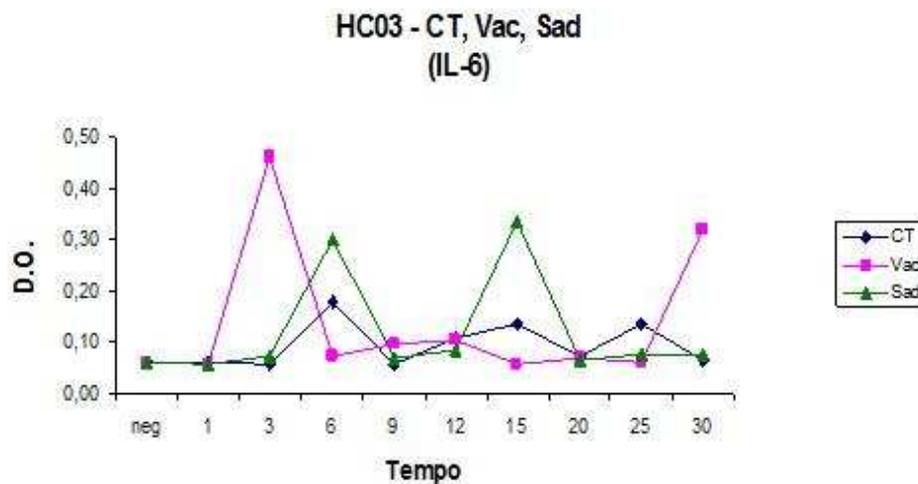


FIGURA 16. Comparação do perfil de liberação de IL-6 em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster tratados com toxóide diftérico (VAC), soro diftérico (SAD) e sem tratamento (CT) desafiados com a cepa HC03. Amostras de soro colhidas nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 pós-desafio.

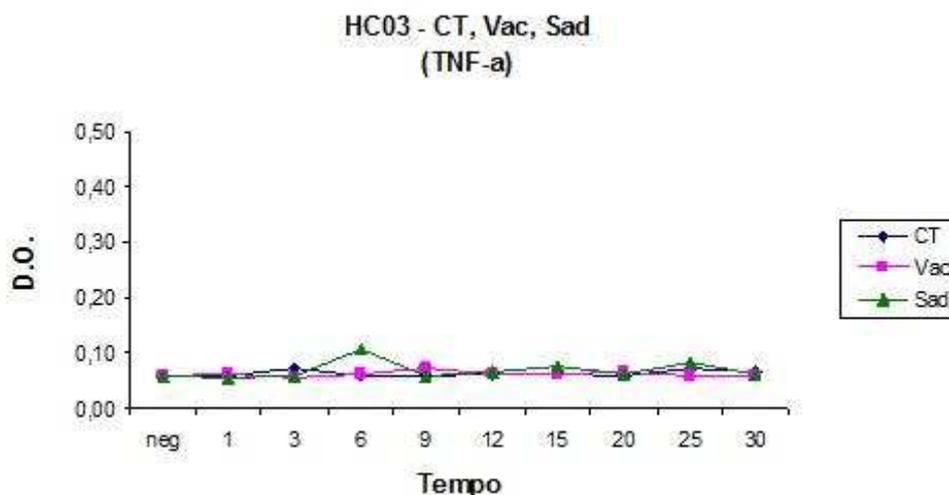


FIGURA 17. Comparação do perfil de liberação de TNF- α em soro de grupos de camundongos das linhagens Swiss Webster tratados com toxóide diftérico (VAC), soro diftérico (SAD) e sem tratamento (CT) desafiados com a cepa HC03. Amostras de soro colhidas nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 pós-desafio.

4.2 . RESULTADOS REFERENTES AO *Corynebacterium ulcerans*

Os resultados parciais deste estudo possibilitaram as seguintes publicações em periódicos especializados:

4.2.1. Artigo publicados ou submetidos

4.2.1.1. *Artigo completo publicado*

Alexandre A.S.O. Dias, Feliciano C. Silva Júnior, Gabriela A. Pereira, Mônica C. Souza, Thereza C.F. Camelo, José A.L.D. Damasceno, Luis G.C. Pacheco, Anderson Miyoshi, Vasco A. Azevedo, Raphael Hirata Júnior, Maria H.S.V. Bôas, and Ana L. Mattos-Guaraldi. Asymptomatic dogs from animal shelters as reservoirs for potentially pathogenic *Corynebacterium ulcerans* in humans. *VEC. BORN. ZON. Dis.* 2010; 10(8): 743-748.

Corynebacterium ulcerans Isolated from an Asymptomatic Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil

Alexandre A.S.O. Dias,¹ Feliciano C. Silva Júnior,¹ Gabriela A. Pereira,² Monica C. Souza,²
 Thereza C.F. Camello,² José A.L.D. Damasceno,² Luis G.C. Pacheco,³ Anderson Miyoshi,³
 Vasco A. Azevedo,³ Raphael Hirata Júnior,² Maria H.S.V. Bôas,¹ and Ana L. Mattos-Guaraldi²

Abstract

Corynebacterium ulcerans was isolated from nares of one asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. The RNA polymerase beta subunit-encoding gene was sequenced to confirm the species identity. *C. ulcerans* strains producing phospholipase D, but not diphtheria toxin, are able to cause severe disease in humans, such as pneumonia and granulomatous nodules in pulmonary tissues. The infection rate varies really widely by region, probably because of the variations in the reported infection rates. Dogs with unapparent *C. ulcerans* infections may be considered as potentially capable of infecting other animals and humans, including pet owners. Medical and veterinary staff should be aware that asymptomatic animals can carry *C. ulcerans* and cooperate in eliminating infections and monitoring animals also in the developing countries.

Key Words: Animal shelter—Asymptomatic dog—*C. ulcerans*.

Introduction

DURING THE LAST 20 YEARS, the frequency and severity of human infection associated with *Corynebacterium ulcerans* appear to be increasing in different countries. The main reservoir of *C. ulcerans* seems to be cattle, in which it may induce mastitis. However, there have been cases of human patients who did not have risk factors associated with *C. ulcerans* infections, such as drinking raw milk or having contact with farm animals or their waste. Recently, there has been concern over transmission of *C. ulcerans* between small animals and humans (Dewinter et al. 2005, De Zoysa et al. 2005, Lartigue et al. 2005, Aaron et al. 2006, Seto et al. 2008, Tiwari et al. 2008, Katsukawa et al. 2009).

C. ulcerans can produce diphtheria (DT) and/or phospholipase D (PlD) toxins and may cause human infections mimicking cutaneous and classical respiratory DT with pseudomembranes (Wagner et al. 2001, Dewinter et al. 2005, Tiwari et al. 2008). *C. ulcerans* is also able to induce clinical signs in the lower respiratory tract such as pneumonia (Hommeze et al. 1999, Hatanaka et al. 2003, Mattos-Guaraldi

et al. 2008a) and granulomatous nodules in the lungs (Desseu et al. 1995). Similar to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains, the pathogenicity of some *C. ulcerans* strains may be independent of the DT production. Bacterial strains induce different clinical symptoms depending on the toxin produced and its levels released in the host. Recently, *C. ulcerans* strains producing DT were isolated from cats with nasal discharge in the United Kingdom (De Zoysa et al. 2005) and from dogs in France (Aaron et al. 2006) and Japan (Katsukawa et al. 2009). Alarming, a human case of DT-like illness, caused by a *C. ulcerans* strain producing a DT-like toxin and likely transmitted by a pet dog with chronic labial ulceration, sneezing, and rhinorrhea, was reported in France (Lartigue et al. 2005).

An emerging infection is one that has newly appeared in the population, or one that has existed but has altered in incidence, geographic range, or character. Many incidences of emergence occur subsequent to the alterations in a combination of pathogen, host, and/or environmental factors. Animal shelters create a uniquely suitable environment for disease emergence. A partial list of factors present in the shelter

¹Post Graduation Program in Health Surveillance-National Institute of Quality Control in Health, Oswaldo Cruz.

²Foundation and Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Medical Relevance, Faculty of Medicine, University of the State of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

environment that could promote emergence includes transportation, stress (immunosuppression), increased contact (overpopulation) and exposure, mixing of species, malnutrition, concurrent disease, high animal turnover, and indiscriminate use of antibiotics. Diseases emerging from shelter populations could be risky to animal and/or human populations (Pesavento et al. 2007).

Recently, we described the first case of *C. ulcerans* human infection in Brazil, and the source of infection was undetermined (Mattos-Guaraldi et al. 2008a). No reports of *C. ulcerans* infections in animals in the developing countries were found in the literature. Neither was found cases of isolation of *C. ulcerans* from the nares of asymptomatic dogs in these countries. These facts led us to investigate the occurrence of *C. ulcerans* in an animal shelter located in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil.

Materials and Methods

Ethical procedures

The study was performed in compliance with the guidelines outlined in the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and with the Brazilian government's ethical guidelines for research involving animals (Fiocruz Ethic Committee for Animal Experiments—CEUA/FIOCRUZ).

Origin of dogs and clinical evaluation

The occurrence of *C. ulcerans* was investigated in apparently healthy dogs (adults, puppies, males, and females) kept in an animal shelter located in Niterói city in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. To rule out the presence of any infectious or debilitating diseases, including dermatoses and the more obvious physical and behavioral abnormalities, a general assessment of each animal's condition and nutritional status was recorded as previously described (CCAC 1984).

Clinical evaluation of the animal infected with *C. ulcerans* included tests for the indicators of renal (urea and creatinine determination) and hepatic (glutamic-oxaloacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase) functions. Additionally, a blood count including leukogram, an abdominal ultrasound, an echocardiogram, and chest X-rays were performed.

Collection and culture of microorganisms

Eye and nasal swabs were obtained from 60 dogs and inoculated onto the chocolate tellurite agar plates and incubated at 35°C for 72 h (Mattos-Guaraldi and Formiga 1998, Efstratiou and George 1999). Samples from skin lesions, when present, were also collected with sterile swabs.

C. ulcerans screening tests

Irregular Gram-positive rod strains were subcultured in the sheep blood agar plates, and *Corynebacterium*-like colonies were preliminarily characterized by Gram staining, colonial morphology, pigmentation, hemolysis (Mattos-Guaraldi and Formiga 1998, Efstratiou and George 1999), and DNase activities. DNase-positive results were mainly observed for *C. ulcerans* but not *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains (Mattos-Guaraldi et al. 2008a, Pimenta et al. 2008).

C. ulcerans phenotypic characterization

The suspect bacterial isolate was identified as *C. ulcerans* by conventional biochemical assays and the semiautomated API-Coryne System (BioMérieux, Lyon, France) (Efstratiou and George 1999, Funke and Bernard 2007, Mattos-Guaraldi et al. 2008a).

C. ulcerans molecular characterization

A multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay targeting the genes 16S rRNA, RNA polymerase beta subunit-encoding gene (*rpoB*), and *pld* was performed as described previously (Pacheco et al. 2007). Primers targeting the *pld* gene designed by aligning the *pld* nucleotide sequences of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* (GenBank accession nos. L16587 and L16585) were used. The reverse primer PLD-R1-AT-CAGCGGTGATTGTCTTCC- was used in association with the forward primer PLD-F-ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA- to amplify the *pld* genes of both bacteria, while primer PLD-R2-ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG- excluded *C. ulcerans*.

Gene sequencing

The *rpoB* was isolated from the genomic DNA of the *C. ulcerans* strain, and a partial sequence was generated for molecular characterization. Briefly, the genomic DNA was extracted by a protocol standardized previously (Pacheco et al. 2007), and a highly polymorphic region of the *rpoB* was amplified by PCR using primers C2700F (5'-CGTATGAACATCGGCCAGGT-3') and C3130R (5'-TCCATTTCGCCGAA GCGCTG-3') (Khamis et al. 2004). The resultant 446 bp amplicon was precipitated with 15% (w/v) polyethylene glycol (Kusukawa et al. 1990) and sequenced using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), following the manufacturer's instructions. The sequence obtained was compared with the previously published *C. ulcerans* *rpoB* sequence (GenBank accession no. AY492271) through search for similarity using the basic local alignment search tool-N (Altschul et al. 1990).

Toxigenicity

As *C. ulcerans* strains may acquire lysogenic corynephages coding for DT, PCR assay for the *tox* gene (using primer sets Dt1, targeting fragment A [nt 43–294]) and Elek test were performed as previously described (Efstratiou and George 1999, Wagner et al. 2001). The presence of Pld was evaluated by the CAMP test (i.e., inhibition of hemolysis by *Staphylococcus aureus*) (Funke and Bernard 2007).

Antimicrobial susceptibility profiles

The sensitivity to antimicrobial agents (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), penicillin G (10 U), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), erythromycin (15 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), ciprofloxacin (5 µg), rifampicin (5 µg), and vancomycin (30 µg), was determined by the disk diffusion method using inocula equivalent to a 0.5 McFarland standard, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines as previously adopted by other authors (Martínez-Martínez et al. 1995, Sing et al. 2003, 2005, Lartigue et al. 2005, Mattos-Guaraldi et al. 2008a). Plates were incubated at 37°C for 24 h and reconfirmed at 48 h using a

cation-adjusted Mueller–Hinton agar with 5% sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the CLSI for bacteria excluded from table 2A to 2K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the one proposed in the CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7) was used (CLSI 2007). The breakpoints for *S. aureus* were considered in the cases of penicillin and ampicillin.

Results

C. ulcerans isolation and phenotypic characterization

From a total of 60 shelter animals, bacterial growth on the chocolate tellurite agar medium was observed in the nasal samples collected from 31 dogs. Twenty-seven irregular Gram-positive rod strains subcultured in the sheep blood agar plates were preliminarily characterized as *Corynebacterium*-like colonies. Five nonpigmented strains isolated from different dogs were DNase positive, and only one strain was positive for both urease and CAMP-reverse tests, suggestive of *C. ulcerans* (named BR-AD22) strain. This dog isolate was positive for catalase, urease, alkaline phosphatase, and α -glucosidase. Nitrate, gelatinase, pyrazinamidase, and

esculin hydrolysis were negative. Fermentation tests were positive for glucose, maltose, and ribose. However, the API code (0111324) for BR-AD22 strain was a better match for *C. pseudotuberculosis* (92.7%) than *C. ulcerans* (7.2%).

C. ulcerans molecular characterization

Results of a multiplex PCR assay performed in an attempt to distinguish between closely related *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* species are displayed in Figure 1. The *rpoB* from BR-AD22 strain was sequenced to confirm the species identity. The partial *rpoB* sequence of the BR-AD22 dog isolate (GenBank accession no. FJ545133) showed 97% of identity (score = 754; *E*-value = 0.0) with the sequence deposited for the type strain CIP106504 of *C. ulcerans* (Fig. 1).

Clinical evaluation of animal infected with *C. ulcerans*

C. ulcerans was isolated from the nares of an asymptomatic 5-year-old female canine of undefined breed, weighing 15 kg. General clinical aspects, laboratorial findings, abdominal ultrasound, echocardiogram, and chest X-rays did not reveal any abnormalities, as exemplified in Figure 2. The dog did not

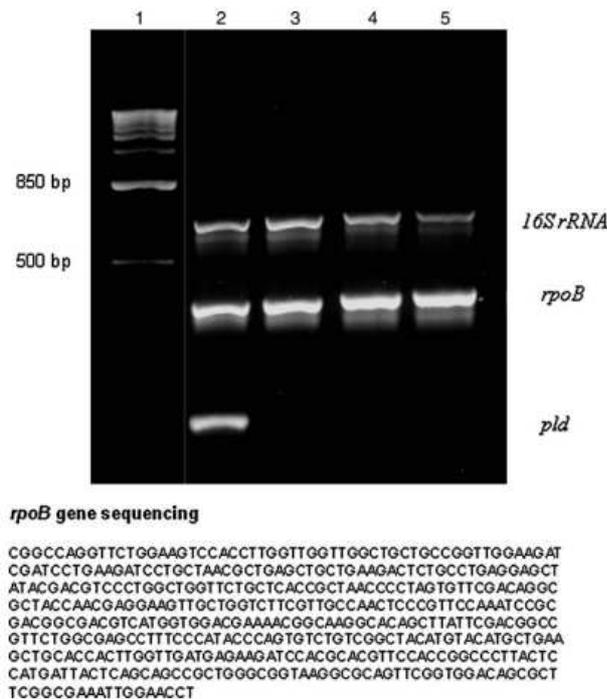


FIG. 1. Multiplex polymerase chain reaction amplification of 16S rRNA (816 bp), RNA polymerase beta subunit-encoding gene (*rpoB*) (446 bp), and phospholipase D (*pld*) (203 bp) gene for differentiation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Corynebacterium ulcerans* strains. Lane 1, 1 kb Plus DNA ladder marker; lane 2, *C. pseudotuberculosis* CIP 102968; lane 3, *C. ulcerans* GUH HJ 01 BM3796.3; lane 4, *C. ulcerans* 809; lane 5, *C. ulcerans* BR-AD22 dog isolate. The partial *rpoB* sequence of the BR-AD22 dog isolate (GenBank accession no. FJ545133) showed 97% of the identity (score = 754; *E*-value = 0.0) with the sequence deposited for the CIP106504 strain of *C. ulcerans*.



FIG. 2. General appearance, frontal chest X-ray, cardiac, and renal ultrasound imaging of the shelter dog colonized by the *C. ulcerans* BR-AD22 strain.

have watery eyes, any nasal discharge, or any skin lesions. Laboratorial analysis of blood samples showed 37.4% Hct, 13 g/% Hgb, $2 \times 10^6/\text{mm}^3$ platelets, $1.39 \times 10^4/\text{mm}^3$ white blood cells, 18 U/L glutamic-oxaloacetic transaminase, 26 U/L glutamic-pyruvic transaminase, 32 mg% urea, and 0.6 mg% creatinine. Results obtained for creatine kinase and creatine kinase isoenzyme (CK MB) sensitive and specific indicators of muscular disorders were 123 and 115 U/L, respectively.

Toxicogenicity

The presence of Pld was confirmed by the positive reverse CAMP test, while the Elek test and PCR assay for the *tox* gene gave negative results.

Antimicrobial susceptibility profiles

C. ulcerans BR-AD22 strain showed resistance only to penicillin G and susceptibility to ampicillin, cephalothin, erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, rifampicin, and vancomycin.

Carrier state

The dog that was colonized by the *C. ulcerans* BR-AD22 strain was kept in quarantine for 6 months, and swabs from throat, nares, eyes, skin, vagina, and ears were collected monthly. After 3 months, antimicrobial therapy was started with ciprofloxacin, 500 mg/day for 15 days. All tests after antimicrobial treatment were negative for *C. ulcerans*, and the animal was considered free of the pathogen. The employees

and the other dogs were also examined monthly with no evidence of *C. ulcerans* carrier state.

Discussion

As the microorganism was found in small groups of apparently healthy dogs during studies performed in both industrialized (Katsukawa et al. 2009) and developing countries, it is safe to assume that dogs may not have any clinically apparent disease when they are colonized by *C. ulcerans*. These findings certainly increase one's concern for the circulation of this pathogen via asymptomatic dogs, especially in metropolitan areas. Dogs with unapparent *C. ulcerans* infections may be considered as potentially capable of infecting other animals and humans. Veterinary clinics should implement guidelines for dealing with *C. ulcerans*. Medical and veterinary staff should be aware that asymptomatic animals can carry *C. ulcerans* in the throat (Katsukawa et al. 2009) or nares and cooperate in eliminating infections and monitoring animals.

More than 90% of the expected population growth in the coming decades will be in the developing regions. Continuing global population growth, combined with rapid urbanization, means that many millions of city dwellers are forced to live in overcrowded and unhygienic conditions, where lack of clean water and adequate sanitation provide breeding grounds for infectious diseases. Expanding areas of human habitation put additional millions of people at risk from pathogens previously rare or unknown causes of human disease. Millions of people in emerging countries live and work in rural areas.

Although most cases of the human patients have risk factors associated with *C. ulcerans* infections, such as drinking raw milk or contact with farm animals or their waste, interestingly, we found in the literature very few cases of *C. ulcerans* infections in humans or animals from developing countries.

Virulence mechanisms of *C. ulcerans* should become a matter of higher interest because of the increase in the number and severity of cases of human infection in different countries, especially those with immunization programs that have rendered DT rare. Similar to *C. diphtheriae* (Sing et al. 2003, 2005), the pathogenicity of some *C. ulcerans* strains may be independent of DT toxin production. Like other human or animal pathogens, *C. ulcerans* strains seem to be endowed with an array of virulence factors other than DT such as catalase, proteases, deoxyribonuclease, and Pld. Different from *C. diphtheriae*, when the *tox* gene is absent in *C. ulcerans*, Pld is the characteristic toxin produced. Dermonecrotic lesions caused by *C. ulcerans*, including the AD22 dog isolate, exhibit a large extent of yellowish-white fibrinous (fibrin) deposits (Mattos-Guaraldi et al. 2008b). Pld is also the causative agent of severe tissue necrosis in humans. To date, Pld is the most important virulence determinant identified in *C. pseudotuberculosis* and causes an increase in vascular permeability, has dermonecrotic properties, and reduces viability of neutrophils and macrophages (Schmiel and Miller 1999). *C. ulcerans* strains producing Pld, but not DT toxin, are able to cause severe disease in humans, such as pneumonia (Hommez et al. 1999, Hatanaka et al. 2003) and granulomatous nodules in pulmonary tissues (Desseau et al. 1995). Consequently, we do believe that the rarity of cases might be not due to a low pathogenicity of *C. ulcerans* as stated before by Funke and Bernard (2007). *C. ulcerans* strains unable to produce DT toxin should not be underestimated.

There is a great variation in the rates of infection from region to region; however, this is probably due to the variation in the rate of disease notification, rather than of the incidence itself. Some diseases have certain geographic distribution where the physicians of these areas may be not familiar with them, and most of their knowledge is from the literature.

Acknowledgments

We thank Dr. Samura Ferreira for providing clinical assistance during surveillance and treatment of the quarantined dog. This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPERJ, SR-2/UERJ, PRONEX of the Brazilian Ministry of Science and Technology, and Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD (CAPES/MEC).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Aaron, L, Heurtebise, F, Bachelier, MN, Guimard, Y. Pseudo-membranous diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*. *Rev Med Interne* 2006; 27:333-335.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, Lipman, DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-410.
- [CCAC] Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, volume II, 1984. Available at www.ccaac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimalsV2_GDL.pdf, accessed in 09-03-08.
- [CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, approved guideline. CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7). Wayne, PA: CLSI, 2007: 4-6.
- Desseau, RB, Brandt-Christensen, M, Jensen, OJ, Tonnesen, P. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. *Eur Respir J* 1995; 8:651-653.
- Dewinter, LM, Bernard, KA, Romney, MG. 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* 2005; 43:3447-3449.
- De Zoysa, A, Hawkey, PM, Engler, K, George, R, et al. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4377-4381.
- Efstratiou, A, George, RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. *WHO Commun Dis Public Health* 1999; 2:251-257.
- Funke, G, Bernard, AK. Coryneform Gram-positive rods. In: Murray, PR, Baron, EJ, Jorgensen, JH, Landry, ML, Pfaller, MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2007:485-514.
- Hatanaka, A, Tsunoda, A, Okamoto, M, OoE, K, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:752-753.
- Hommez, J, Devriese, LA, Vanechoutte, M, Riegel, P, et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:954-957.
- Katsukawa, C, Kawahara, R, Inoue, K, Ishii, A, et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from the domestic dog for the first time in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62:171-172.
- Khamis, A, Raoult, D, La Scola, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3925-3931.
- Kusukawa, N, Uemori, T, Asada, K, Kato, I. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990; 9:66-72.
- Lartigue, MF, Monnet, X, Lê Fleche, A, Grimont, PA, et al. *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *J Clin Microbiol* 2005; 43:999-1001.
- Martinez-Martinez, L, Ortega, MC, Suarez, AI. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1318-1321.
- 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.
- Mattos-Guaraldi, AL, Sampaio, JLM, Santos, CS, Pimenta, FP, et al. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in human with pulmonary infection in Rio De Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008a; 103:396-400.
- Mattos-Guaraldi, AL, Villas Boas, MHS, Dias, AASO, et al. *Corynebacterium ulcerans* infecting humans and dogs in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. Presented at the Proc. Second Annual Meeting of DIPNET & Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Larnaca, Cyprus, 2008b, p. 61.

- Pacheco, LG, Pena, RR, Castro, TL, Dorella, FA, et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol* 2007; 56:480-486.
- Pesavento, PA, Barnasch, MJ, Bachmann, R, Byrne, BA, Hurley, KF. Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats. *Vet Pathol* 2007; 44:218-221.
- Pimenta, FP, Souza, MC, Pereira, GA, Hirata, R Jr., et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46:307-311.
- Schmiel, DH, Miller, VJ. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* 1999; 1:1103-1112.
- Seto, Y, Komiya, T, Iwaki, M, Kohda, T, et al. Properties of corynephage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2008; 1:116-122.
- Sing, A, Bierschenk, S, Heeseemann, J. Classical diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: amino acid sequence differences between diphtheria toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Clin Infect Dis* 2005; 15:325-326.
- Sing, A, Hogardt, M, Bierschenk, S, Heeseemann, J. 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* 2003; 41:4848-4851.
- Tiwari, TS, Golaz, A, Yu, DT, Ehresmann, KR, et al. Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis* 2008; 46:395-401.
- Wagner, J, Ignatius, R, Voss, S, Hopfner, V, et al. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1598-1600.

Address correspondence to:

Ana L. Mattos-Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Av. 28 de Setembro, 87-Fundos, 3º andar, Vila Isabel

Rio de Janeiro, RJ CEP 20 551-030

Brazil

E-mail: guaraldi@pq.cnpq.br; guaraldi@uerj.br

4.2.1.2. Artigos completos submetidos à publicação

A.A.S.O. DIAS, L.S. SANTOS, P.S. SABBADINI, C.S. SANTOS, F.C. SILVA JR, F. NAPOLEÃO, P.E. NAGAO, M.H.S. VILLAS-BÔAS, R. HIRATA Jr, A.L. MATTOS-GUARALDI. Difteria pelo *Corynebacterium ulcerans*: uma zoonose emergente no Brasil e no mundo. ARTIGO DE REVISÃO. Submetido a Revista de Saúde Pública em 28-11-2010 (ANEXO B).

A.A.S.O. DIAS, F.C. SILVA JR, P.S. SABBADINI, L.S. SANTOS, M.M. RIBEIRO-CARVALHO, C.S. SANTOS, A.A. FILARDY, R. HIRATA Jr, M.H.S. VILLAS-BÔAS, A.L. MATTOS-GUARALDI. Strain dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. Submetido a Revista Veterinary microbiology. (ANEXO B)

4.2.2. Artrite experimental em camundongos

Grupos de camundongos da linhagem SW, machos e fêmeas, de 18 a 22 gramas foram infectados com 0,5 mL via endovenosa com uma suspensão de 4×10^8 bactérias por mL de diferentes cepas de *C. ulcerans* (809 (isolado humano), CDC-KC279 e BR-AD22 (isolados veterinários)). A **Figura 18** apresenta os diferentes percentuais de camundongos que foram a óbito após a infecção. Estão registrados 2 momentos distintos durante a realização do ensaio, dia 10 após a infecção e dia 30 após a infecção. Sob condições idênticas de experimentação observa-se o maior grau de letalidade da cepa de *C. ulcerans* denominada 809 tanto no primeiro período de registro (10 dias pós-infecção) onde 53% dos camundongos não sobreviveram quanto em um segundo momento, onde ocorreram mais óbitos perfazendo um total de 60% dos animais experimentados. Nos primeiros 10 dias pós-infecção tanto a cepa padrão CDC-KC279 quanto à cepa recentemente isolada de canino na região metropolitana do Rio de Janeiro não apresentaram óbitos. Ao término do experimento a cepa padrão de *C. ulcerans* apresentou um total de 7% de

óbitos entre os animais inoculados enquanto a cepa BR-AD22 permaneceu sem causar morte em camundongos.

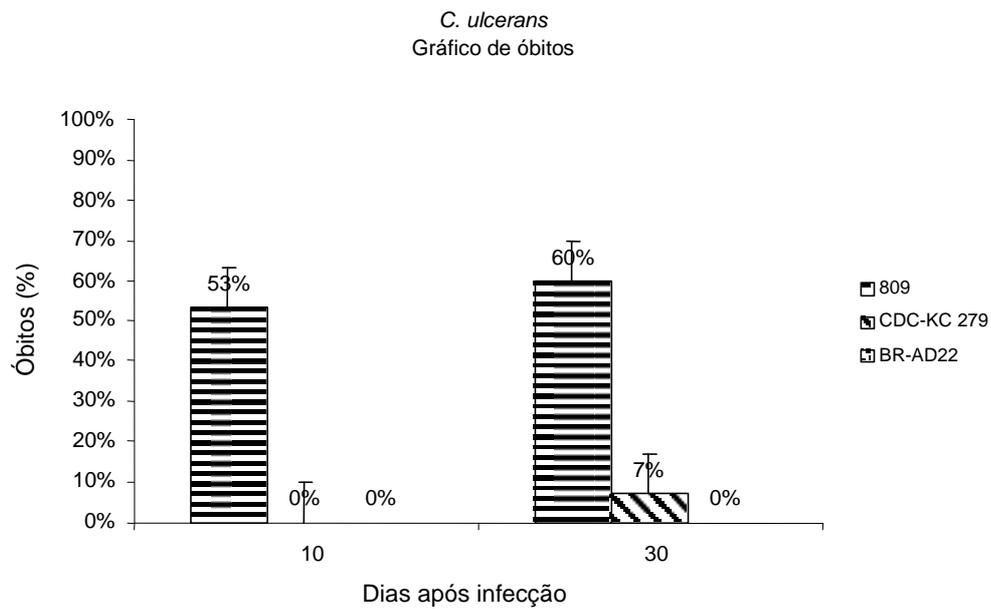


Figura 18. Percentagem de óbitos entre os animais infectados com as cepas de *Corynebacterium ulcerans*

Entre os camundongos infectados com a cepa 809, 71,42% apresentaram sinais clínicos de artrite e nos camundongos infectados com a cepa CDC-KC279 84,61% foram positivos e no grupo infectado com a cepa denominada BR-AD22 os animais não apresentaram sinais de artrite (**Figura 19**). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P=0,0173$).

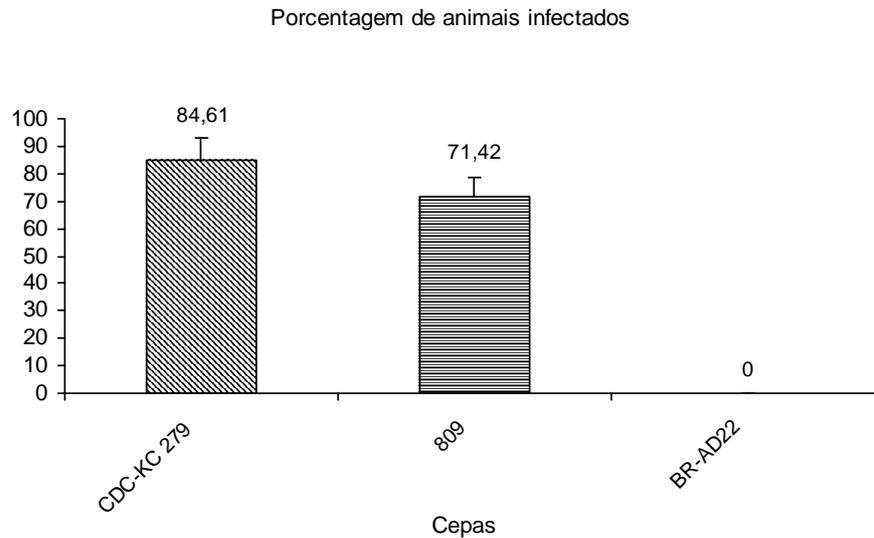


Figura 19. Percentagem dos animais da linhagem Swiss Webster que apresentaram sinais clínicos de artrite após infecção pelo *Corynebacterium ulcerans* de acordo com as diferentes cepas estudadas

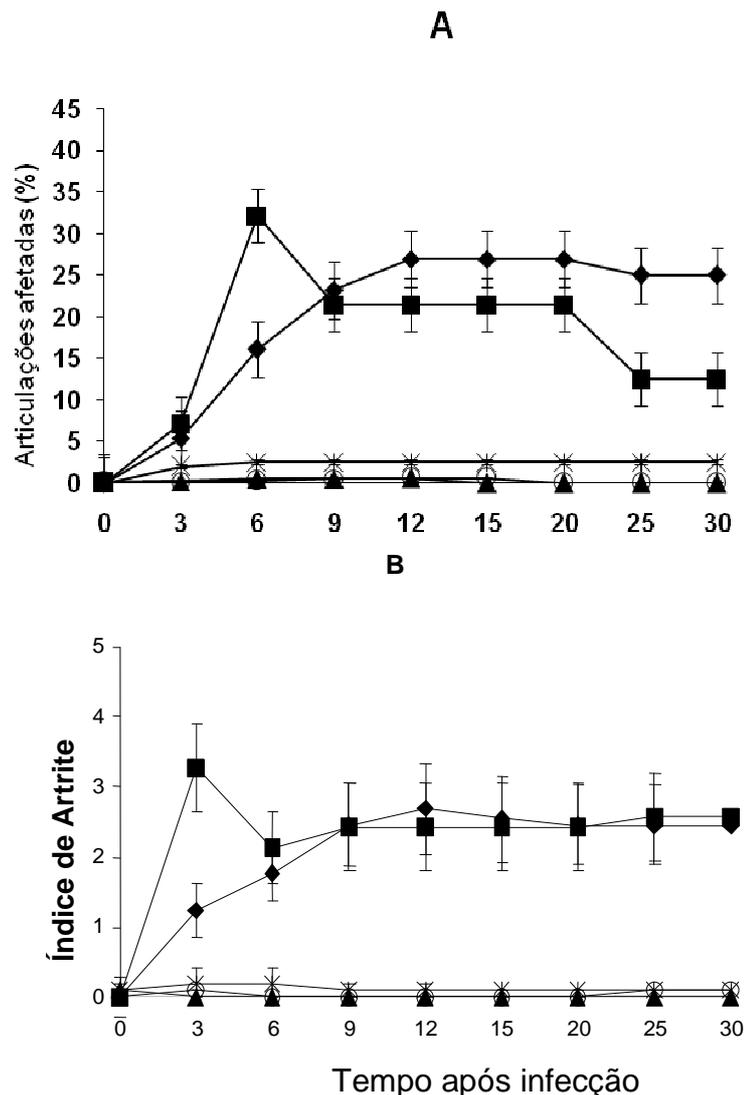
4.2.2.1. Sítios atingidos pelo *Corynebacterium ulcerans* após o desafio endovenoso

Em nossos ensaios pudemos observar, em diferentes intervalos de tempo, de acordo com a cepa utilizada, a presença de microrganismos em vários órgãos e tecidos. Em amostras de sangue pudemos detectar microrganismos até o terceiro dia pós-desafio nos grupos tratados com as cepas 809 e CDC-KC279, enquanto que a cepa BR-AD22 só permitiu tal detecção no primeiro dia após o desafio.

Nas amostras de rins, fígado e baço a cepa CDC-KC279 demonstrou maior capacidade de permanecer nos tecidos hospedeiros até o sexto dia enquanto as cepas 809 e BR-AD22 foram detectadas até o quarto dia. Nas amostras provenientes de articulações as três cepas testadas apresentaram a mesma capacidade, permanecendo no tecido hospedeiro até o vigésimo dia após infecção. Não foram detectados bacilos nas amostras de pulmão e coração.

4.2.2.2. Potencial artritogênico durante infecção por Corynebacterium diphtheriae e Corynebacterium ulcerans

Foram observadas diferenças entre as cepas avaliadas, o isolado de origem humana 809 foi o mais artritogênico ao sexto dia em comparação com a cepa tipo CDC-KC279 ($P = 0,0466$), no período compreendido entre o nono e o trigésimo dia pós-infecção estas cepas apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($P = 0,0911$) (**Figura 19**). As amostras também foram avaliadas por sua capacidade de afetar as articulações. O número de articulações acometidas, com qualquer nível de artrite, foi correlacionado com o total de articulações possíveis e, em seguida, foi estabelecido um percentual plotado na **Figura 19**. Esse resultado foi muito semelhante ao índice da artrite, quando a cepa 809 apresentou seu pico no sexto dia após a infecção e até o final do experimento seus resultados demonstraram a semelhança com a cepa CDC-KC279.



Cepas/ Incidência	CDC-KC279	809	BR-AD 22	ATCC27010	ATCC27012
CDC-KC279	1	0,3505	0,0004	0,0006	0,0004
809	0,3505	1	0,0008	0,0014	0,0008
BR-AD 22	0,0004	0,0008	1	<0.0001	1
ATCC27010	0,0006	0,0014	<0.0001	1	<0.0001
ATCC27012	0,0004	0,0008	1	<0.0001	1

Cepas/ Severidade	CDC-KC279	809	BR-AD22	ATCC27010	ATCC27012
CDC-KC279	1	0,5299	0,0002	0,0004	0,0002
809	0,5299	1	0,0003	0,0004	0,0003
BR-AD22	0,0002	0,0003	1	0,0001	1
ATCC27010	0,0004	0,0004	0,0001	1	0,0001
ATCC27012	0,0002	0,0003	1	0,0001	1

Figura 20. Incidência (A) e severidade (B) da artrite em camundongos infectados com 2×10^8 bactérias por animal com as cepas de *Corynebacterium diphtheriae* (*, ATCC27010/ Atox e o, ATCC27012/ Tox) e *Corynebacterium ulcerans* (■, 809, ◆, CDC-KC279 e ▲, BR-AD22). Resultados são médias \pm Desvio Padrão de três experimentos. $P < 0.05$ é determinado pelo teste χ^2 test; n, 15 camundongos por grupo.

Na **Figura 21** temos os Índices médios de artrite obtidos ao longo de todo o experimento onde podemos observar o potencial de cada cepa em provocar artrite séptica em camundongos convencionais da linhagem SW. A cepa 809 apresentou potencial artritogênico médio estatisticamente semelhante em comparação com a cepa CDC-KC279 ($P = 0.3842$).

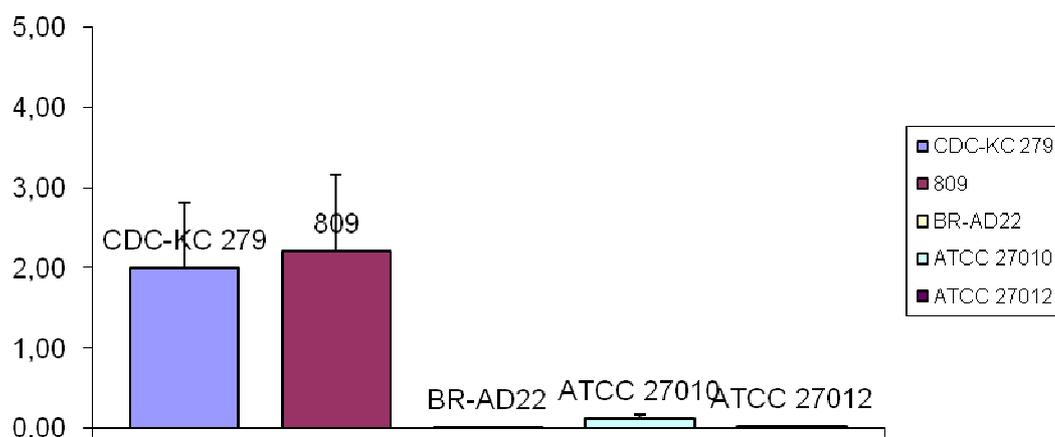


Figura 21. Índices médios de artrite em grupos de camundongos infectados com 2×10^8 bactérias por animal com as cepas de *Corynebacterium diphtheriae* (ATCC27010 e ATCC27012) e *Corynebacterium ulcerans* (809, CDC-KC279e BR-AD22). Resultados são médias e desvio padrão de três experimentos separados. $P < 0,05$ é determinado pelo teste χ^2 test; n, 15 camundongos por grupo.

4.2.3. Produção de citocinas durante infecção por *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

Para verificar o envolvimento de citocinas no modelo de artrite induzida por *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, a produção sistêmica de IL-6 e TNF- α foi investigada em diferentes momentos após a infecção com as diferentes cepas. As amostras de sangue de camundongos infectados foram obtidas em intervalos definidos, as amostras foram preparadas conforme descrito para os testes de ELISA.

Na **Figura 22** temos os níveis médios secretados por citocinas pelos grupos de camundongos desafiados pelas diferentes cepas utilizadas no estudo. Podemos observar que o comportamento das cepas, na estimulação de secreção de citocinas durante o processo infeccioso, foi semelhante. As cepas de *C. ulcerans*809, a cepa tipo CDC-KC279e o isolado canino BR-AD22 estimularam uma maior secreção sérica de ambas as citocinas enquanto as cepas homólogas (ATCC27010 e 27012) apresentaram performances abaixo das cepas de *C. ulcerans*, sendo que na expressão de IL-6 (**Figura 22B**) a cepa ATCC 27010 apresentou níveis um pouco superiores aos apresentados pela cepa ATCC 27012. Exatamente o contrário ocorreu na expressão de TNF- α (**Figura 22A**) onde a cepa ATCC 27012 se mostrou superior.

A **Figura 23** mostra que os níveis de TNF- α e IL-6 foram sempre superiores aos níveis de controle (dia 0), com exceção dos níveis de TNF- α do grupo de camundongos inoculados com a cepa ATCC27012. Os níveis de IL-6 (**Figura 23A**) nas amostras de soros analisadas (até 200 pgmL⁻¹), foram maiores do que os níveis de TNF- α (**Figura 23B**) produzidos (até 140 pgmL⁻¹). Um aumento significativo ($P < 0,001$) nos níveis séricos de TNF- α e IL-6 foram evidentes nos dias um e três dias após a infecção, respectivamente. Foi observada uma diminuição progressiva a partir desses picos até o final do experimento. Altos níveis de IL-6 sistêmico foram encontrados inicialmente em camundongos infectados com cepas do grupo 809 e BR-AD22 (1 dia), enquanto o grupo infectado pela cepa CDC-KC279 mostrou o seu pico no terceiro dia após a infecção. Curiosamente, a cepa BR-AD22 não mostrou a capacidade de induzir sinais clínicos de artrite, mas alcançou o primeiro pico da produção de TNF- α , no primeiro dia após a infecção, enquanto as cepas 809 e CDC-KC279 apresentaram seus picos no terceiro dia após a infecção (**Figura 23 A e B**).

O grupo de camundongos infectados com a cepa toxinogênica ATCC27012 apresentou a menor capacidade de produção sistêmica de IL-6 e TNF- α . As cepas de *C. diphtheriae* apresentaram a menor capacidade para a produção de IL-6 e TNF- α . Em nossos experimentos os níveis séricos de IL-6 mostraram uma tendência de redução até o vigésimo dia, enquanto o oposto ocorre com os níveis de TNF- α . No vigésimo dia, temos uma clara tendência de alta, especialmente nos grupos infectados por cepas 809 e CDC-KC279 e, em menor grau com a cepa ATCC27012.

Esta elevação parece estar relacionada com a manutenção de artrite em camundongos SW (**Figura 20**), o que seria explicado por um novo ciclo de crescimento bacteriano e conseqüente recrutamento de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias. Com exceção da cepa BR-AD22, que não produziu a artrite em ratos, pode-se observar uma correlação entre os resultados do índice de artrite (**Figura 24**) e níveis de IL-6 e TNF- α no soro de camundongos (**Figuras 22 e 23**).

Na verdade, níveis sistêmicos sustentados de IL-6 foram detectados em camundongos logo após a infecção, seguidos de um decréscimo gradual nos dias subseqüentes (**Figura 23**). No início, a produção de TNF- α também foi evidente, mas, diferentemente da IL-6, continuou a aumentar, atingindo concentração máxima no dia 3, e após este prazo diminui progressivamente. Em nossos experimentos os níveis de IL-6 mostraram uma tendência de queda até o vigésimo dia, enquanto o oposto ocorre com os níveis de TNF- α . No vigésimo dia, temos uma clara tendência ascendente, especialmente nos grupos infectados por cepas 809 e CDC-KC279, em menor grau com a cepa ATCC27012.

Não houve diferença entre os níveis de TNF- α e IL-6 observados com a cepa ATCC27012, até o décimo quinto dia, quando foi observado um aumento gradual. Em contraste, a infecção com todas as cepas de *C. ulcerans* foi caracterizada por uma produção sistêmica rápida e duradoura de TNF- α e IL-6, que aumenta ao longo dos primeiros três dias do período de observação, quando inicia um declínio gradual até o décimo quinto dia com nova tendência de alta (**Figura 23**).

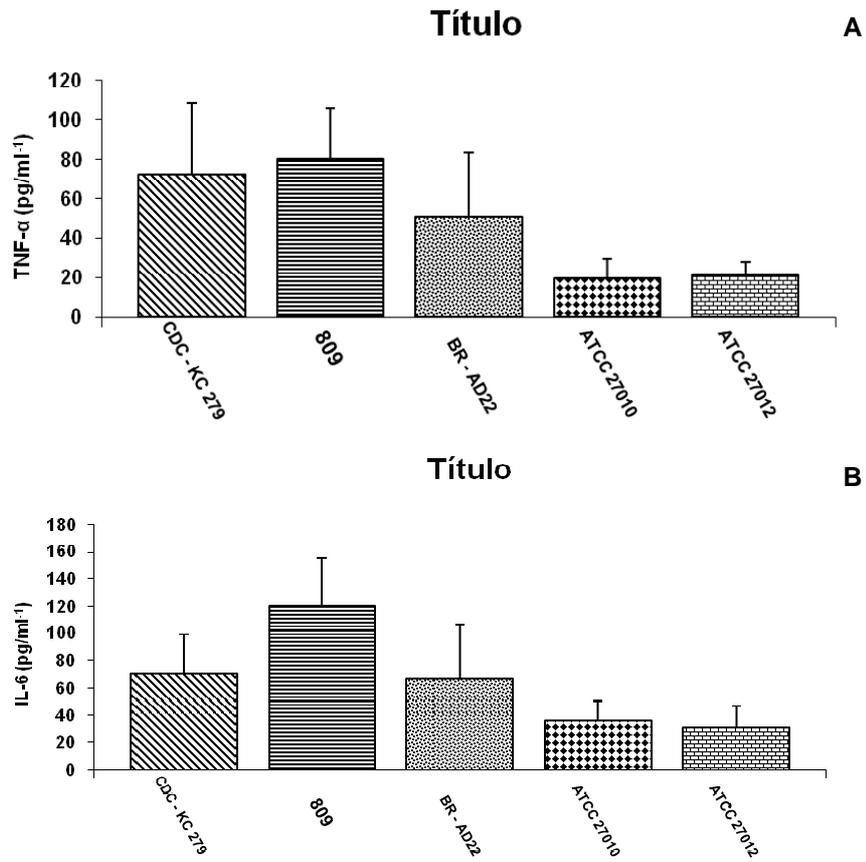
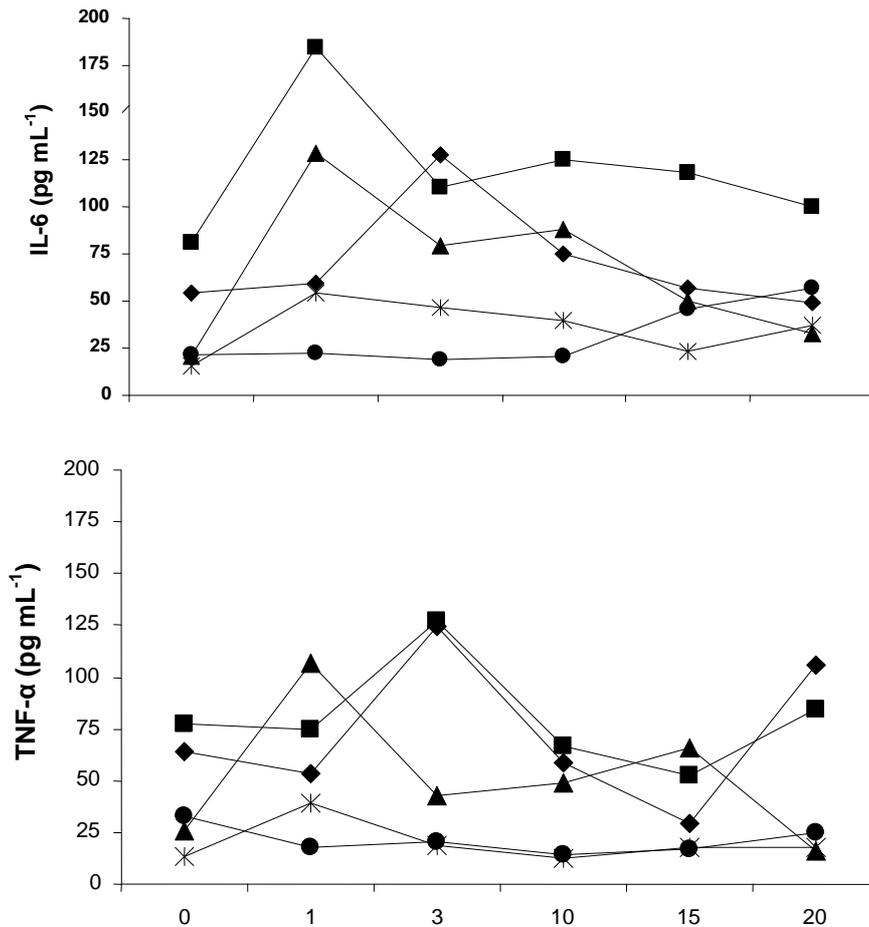


Figura 22. Títulos médios obtidos nas dosagens de citocinas TNF- α (**A**) e IL-6 (**B**) obtidos por cada cepa em amostras de soro provenientes de grupos de camundongos convencionais Swiss Webster.



P (IL-6)					
Cepas	CDC-KC279	809	BR-AD22	ATCC27010	ATCC27012
CDC-KC279	1	0,0240	0,8690	0,0287	0,0167
809	0,0240	1	0,0347	0,0003	0,0002
BR-AD22	0,8690	0,0347	1	0,1079	0,0695
ATCC27010	0,0287	0,0003	0,1079	1	0,5716
ATCC27012	0,0167	0,0002	0,0695	0,5716	1

P (TNF-α)					
Cepas	CDC-KC279	809	BR-AD 22	ATCC27010	ATCC27012
CDC-KC279	1	0,6722	0,2939	0,0055	0,0057
809	0,6722	1	0,1100	0,0002	0,0003
BR-AD22	0,2939	0,1100	1	0,0490	0,0531
ATCC27010	0,0055	0,0002	0,0490	1	0,7890
ATCC27012	0,0057	0,0003	0,0531	0,7890	1

Figura 23. Níveis de IL-6 (A) e TNF- α (B) detectados em soro de camundongos infectados pelas cepas de *Corynebacterium diphtheriae* (✱, ATCC27010/Atox e \circ , ATCC27012/Tox) e *Corynebacterium ulcerans* (■, 809, ◆, CDC-KC279 e ▲, BR-AD 22) em diferentes intervalos de tempo pós infecção. Os níveis de citocinas foram determinados por teste de ELISA e expressos através das medias em três experimentos em separados, os valores são em pgmL⁻¹ de soro. P<0,05 é determinado pelo teste χ^2 test; n, 5 camundongos por grupo. Os valores dos desvios padrões, usualmente inferiores a 10%, foram omitidos.

Na **Figura 24** estão expressos os níveis médios das citocinas (TNF- α e IL-6) e o percentual de camundongos afetados por cada uma das cepas utilizadas no estudo. Percebe-se que as cepas que induziram a uma maior produção de citocinas, tanto TNF- α quanto IL-6, foram também as que obtiveram maior percentual de camundongos afetados. As três cepas de *C. ulcerans* apresentaram os maiores índices em todos os três fatores avaliados neste gráfico, a exceção do percentual de animais infectados onde a cepa de *C. diphtheriae* ATCC27010 apresentou índice pouco superior a cepa de *C. ulcerans* BR-AD22.

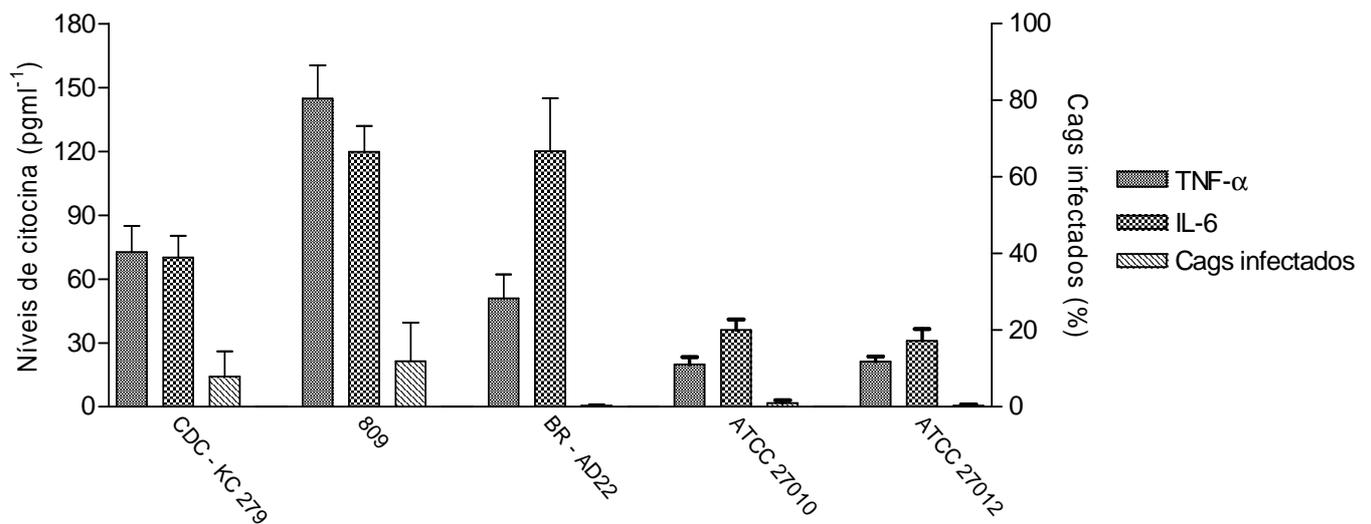


Figura 24. Percentual de animais infectados e títulos médios das citocinas (TNF- α e IL-6) e obtidos por cada cepa em amostras de soro provenientes de grupos de camundongos convencionais Swiss Webster infectados pelas cepas de *Corynebacterium ulcerans* (CDC-KC279, 809 e BR-AD22) e *Corynebacterium diphtheriae* (ATCC27010 e ATCC27012).

4.2.4. Avaliação Histopatológica

Os estudos histopatológicos das articulações de camundongos infectados com diferentes cepas de *C.diphtheriae* e *C. ulcerans* foram realizados para confirmar os sinais clínicos de artrite. Observamos anteriormente que as patas que não apresentaram sinais macroscópicos de artrite também não demonstraram as características histológicas de artrite. Assim, optou-se por comparar histopatologicamente patas que apresentam sinais clínicos de artrite e patas normais **(Figura25)**. No 8º dia após a infecção, três patas afetadas foram examinadas em cada grupo de camundongos. Basicamente, foi observado o mesmo resultado histopatológico (edema subcutâneo, o infiltrado inflamatório, os danos ao tecido ósseo e hipertrofia de sinoviócitos) para articulação afetadas por *C.diphtheriae* e *C. ulcerans* com maior intensidade para as últimas. Quanto ao aspecto visual, há diferenças significativas entre os aspectos clínicos da artrite causada por *C.diphtheriae* e *C. ulcerans*. A artrite causada pela infecção por *C. ulcerans* além da deformidade, inchaço, edema comumente apresenta ulceração de pele além de extensa necrose no local da inoculação (veia da cauda).

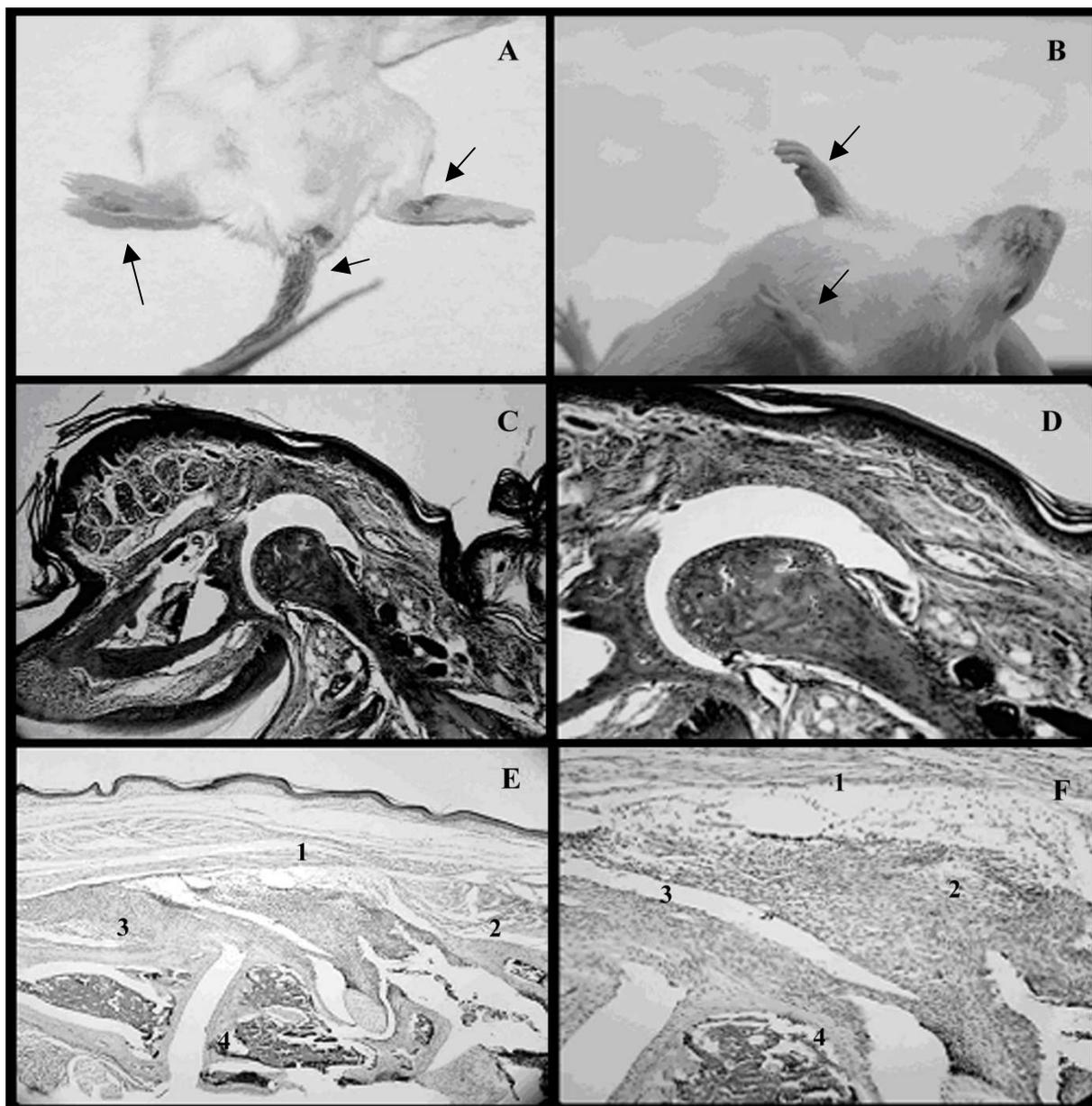


Figura 25. Aspectos clínicos e avaliação histopatológica da artrite em camundongos Swiss Webster 8 dias após a infecção com cepas de *Corynebacterium ulcerans* (A) e *Corynebacterium diphtheriae* (B). Avaliação Histopatológica da artrite em camundongos Swiss Webster 8 dias após a infecção com cepas de *C. ulcerans*– Articulação normal (C); 40X (D); 100X. Alterações Histopatológicas causadas pelo *C. ulcerans*: edema subcutâneo (1), infiltrado inflamatório (2), destruição do tecido ósseo (3) e hipertrofia dos sinoviócitos (4) (E); 40X (F); 100X.

5. DISCUSSÃO

Na atualidade, o número de casos confirmados de difteria nos diferentes continentes alerta para a possibilidade de ocorrência de epidemias de doenças imunopreveníveis em todo o mundo. Os programas de vacinação contra a difteria, quando seguidos adequadamente, são capazes de conter o avanço de epidemias, porém não conseguem erradicar na população, os indivíduos portadores assintomáticos das espécies de corinebactérias potencialmente produtoras de toxina diftérica, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*.

Além dos casos de difteria clássica, *C. diphtheriae* também pode causar infecções localizadas do trato respiratório (faringites, pneumonias), quadros de bacteremias, paralisias, danos cerebrais e abscessos no fígado e baço, além de endocardite, meningite, osteomielite e artrite séptica (HONMA et al., 1989; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998a; MATTOS-GUARALDI et al., 2001; DZUPOVA et al., 2005; HIRATA Jr et al., 2008). Sinais e sintomas de osteoartrite tem sido descritos em 27-50% dos casos de infecção sistêmica relacionados tanto com cepas toxinogênicas quanto toxigenicas(TILEY et al., 1993, PATEY et al., 1997). As epidemias de difteria ocorridas nas últimas décadas têm forçado uma geração de clínicos, laboratoristas e epidemiologistas em diversas partes do mundo a relembrar velhas lições e desenvolver novos métodos de diagnóstico microbiológico, prevenção, controle e tratamento da difteria. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que investigam *in vivo* e *in vitro* os fatores que influenciam o estabelecimento e/ou a disseminação de amostras potencialmente invasoras de *C. diphtheriae*.

Atualmente também tem sido observado na literatura um crescente número de casos de difteria zoonótica causada pelo *C. ulcerans*, que se apresenta como um desafio adicional para os órgãos de Saúde Pública de diversos países, inclusive o Brasil (WAGNER et al., 2010). A maioria dos casos relatados em alguns países da Europa, como a Inglaterra, apresentou cães e gatos como reservatório primário do patógeno (LARTIGUE et al., 2005; AARON et al., 2006; HOGG et al., 2009). Deste modo, tornou-se necessária à implementação no diagnóstico laboratorial de esquemas rápidos e acurados que permitissem o isolamento e a identificação de *C. ulcerans*. A semelhança do ocorrido com o *C. diphtheriae* na última década, a

possibilidade de surtos de difteria ocasionados pela dispersão de clones de *C. ulcerans* capazes de infectar humanos e serem produtoras de toxina diftérica, diferente daquela utilizada nas preparações vacinais utilizada nos programas mundiais de imunização contra a difteria, também não deve ser negligenciada (WAGNER et al., 2010).

Conforme descrito na introdução deste trabalho de tese, 37 artigos publicados na literatura internacional descreveram estudos relacionados com infecções de *C. ulcerans* em humanos. Uma predominância de casos (65%) e óbitos (66%) foi observada em indivíduos do sexo feminino. Vale ressaltar que a maioria das infecções em animais pelo *C. ulcerans* também ocorreu em fêmeas (mastites). Wagner e colaboradores (2010) realizaram um levantamento dos casos de infecções por *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* ocorridos na Inglaterra, no período de 1986 a 2008, encontrando, também, predominância de casos em mulheres (76%). Este fato também foi observado quanto à ocorrência de óbitos em mulheres com 75% dos casos. Os autores observaram que a média de idade dos indivíduos portadores de *C. ulcerans* (38 anos) foi mais elevada que a média dos portadores de *C. diphtheriae* (15 anos). Do mesmo modo, o caso descrito no Brasil enfatizou a tendência dos portadores de *C. ulcerans* poderem pertencer a faixa etárias mais elevadas (MATTOS-GUARALDI et al., 2008; WAGNER et al., 2010), com uma média de 53 anos de idade, contrastando fortemente ao que é historicamente observado nos casos de infecção por *C. diphtheriae* no Brasil e no mundo.

Tendo em vista a circulação mundial do *C. ulcerans* e a falta de notificações nos continentes asiático, africano e Oceania uma melhor capacitação laboratorial, um maior cuidado na coleta e processamento das amostras suspeitas poderá contribuir para a redução de subnotificações decorrentes de resultados laboratoriais falso-negativos. Em países em desenvolvimento onde a incidência de difteria permanece relativamente alta e a cobertura vacinal continua insuficiente, o suporte laboratorial deve ser implementado visto às deficiências recorrentes neste segmento. Acreditamos necessária a disponibilização de esquema de triagem acurado, rápido, econômico e de fácil execução, capaz de permitir a realização do diagnóstico presuntivo de casos de difteria causados tanto pelo *C. ulcerans* quanto pelo *C. diphtheriae* na maioria dos laboratórios brasileiros. No Brasil, os laboratórios deverão estar atentos para esse novo desafio, e aqueles que não apresentarem recursos disponíveis para a execução de testes de toxigenicidade devem enviar as cepas

para análises complementares, ao Laboratório Central de Saúde Pública de sua região e/ou ao Laboratório de Referência Nacional e/ou ao Centro Colaborador em difteria. Recentemente foi emitida uma Nota Técnica pelo Ministério da Saúde que alerta sobre a difteria no Brasil (BRASIL, 2010). Este documento informa que foram observadas mudanças no perfil clínico-epidemiológico da doença, tais como ausência de pseudomembranas e desvio de faixa etária, e que também foi descrito casos de infecção humana de *C. ulcerans* em área metropolitana (MATTOS-GUARALDI et al., 2008). No presente estudo demonstramos que no Brasil pode ser observada a presença de *C. ulcerans* em populações de caninos mantidos em instituição destinada ao abrigo de animais domésticos localizados em áreas metropolitanas.

Segundo Pesavento e colaboradores (2007) vivemos uma era de reemergência de várias doenças onde algumas hipóteses buscam explicar esta ocorrência: status sanitário da população, migrações, ambientação dos patógenos às novas condições, fatores ambientais entre outros. Segundo o autor, abrigos animais apresentariam várias condições predisponentes para este fenômeno: stress, imunossupressão, superpopulação, alta exposição, alta rotatividade animal, nutrição e uso indiscriminado de antibióticos tornando-se um fator de risco para população humana e animal.

Cães assintomáticos com infecções pelo *C. ulcerans* podem ser considerados como potencialmente capaz de infectar outros animais e seres humanos. Deste modo, clínicas veterinárias devem implementar diretrizes para lidar com *C. ulcerans* em nosso ambiente. Profissionais da área médico-veterinária devem permanecer atentos ao fato, de modo a auxiliar no monitoramento e tratamento de infecções em animais, também nos países em desenvolvimento. Nas próximas décadas é esperado que mais de 90% do crescimento da população ocorra em regiões urbanas de países em desenvolvimento. O contínuo crescimento da população mundial, combinado com a rápida urbanização, significa que milhões de moradores das metrópoles sejam forçados a viver em condições de superlotação e de pouca higiene, onde a falta de água potável e de saneamento básico fornecem condições favoráveis para o estabelecimento de doenças infecciosas de origens diversas, inclusive as de natureza zoonótica. Este fato também permitirá colocar milhões de pessoas em risco quanto à ação de microrganismos considerados raros ou desconhecidos como agentes causadores de doenças humanas.

Adicionalmente, milhões de pessoas em países emergentes vivem e trabalham nas zonas rurais. Embora na maioria dos casos no ambiente rural os pacientes tenham apresentado fatores de risco associados a infecções pelos *C. ulcerans*, como contato com animais, ingestão de leite cru ou de derivados, curiosamente, encontramos na literatura um número muito reduzido de casos relatados de infecções humanas pelo *C. ulcerans* em humanos ou animais ocorridos em países em desenvolvimento. O aumento do número e a gravidade de casos de infecção humanas em diferentes países, especialmente naqueles com programas de imunização que tornaram raros os casos clássicos de difteria (Sing et al., 2003) motivaram os estudos de mecanismos de virulência de *C. ulcerans*.

Os resultados do presente estudo também permitiram ampliar os dados relacionados as propriedades invasivas de amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* através da utilização de modelos experimentais em animais murinos.

Em nosso estudo, foram avaliados modelos experimentais de infecção utilizando cobaias infectados pela via intracardíaca para observação do desenvolvimento de endocardite bacteriana, e um modelo utilizando camundongos infectados por via intranasal para observação do desenvolvimento de pneumonias. Infelizmente, no modelo de desenvolvimento de endocardite em murinos foram observados apenas resultados negativos para todas as amostras testadas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. A dificuldade de padronização deste modelo experimental para *C. diphtheriae* pode ser um fator que vem contribuindo parcialmente para a ausência de estudos in vivo realizados de endocardite pelo bacilo diftérico descritos na literatura internacional.

No modelo intranasal, apenas uma cepa *C. diphtheriae* pertencente ao biotipo belfanti (amostra 402/Brasil) conseguiu colonizar o trato respiratório inferior (pulmões) de camundongos SW convencionais. O dado interessante é que esta foi a única cepa de *C. diphtheriae* dentre as estudadas, que foi isolada de paciente com quadro de pneumonia. O dado reenfata a possibilidade de uma adaptação natural prévia ao trato respiratório inferior adquiridas pelas amostras pertencentes ao biotipo belfanti, conforme descrito anteriormente por Patey e colaboradores (1997). Em nosso estudo com este modelo experimental, não foi possível a recuperação dos microrganismos a partir de outros órgãos além dos pulmões.

Na tentativa de investigar os possíveis mecanismos de infecção e disseminação de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* foi preconizado um modelo

experimental *in vivo* utilizando camundongos convencionais SW injetados intravenosamente na veia caudal com amostras de diferentes origens. A metodologia de execução deste modelo experimental foi baseada em métodos aplicados anteriormente para amostras de *Staphylococcus aureus* (BREMELL et al., 1991), *Streptococcus agalactiae* (TISSI et al., 1999, PULITI et al., 2001) e *C. diphtheriae* (PULITI et al., 2006). Os autores observaram que em camundongos de tipos distintos, infecções invasivas pelos três patógenos foram acompanhadas pelo aparecimento de lesões articulares em um número significativo de animais, sendo em algumas oportunidades o potencial artritogênico dependente não só da cepa e da espécie do patógenos testado, mas também do tipo genético de camundongo utilizado nos desafios.

No presente estudo foi demonstrado potencial artritogênico para a cepa tipo *C. diphtheriae* ATCC27010 semelhante ao observado para cepas atoxinogênicas estudadas por Puliti colaboradores (2006). Interessantemente, a cepa homóloga, porém toxinogênica, ATCC27012 foi incapaz de induzir qualquer sinal clínico de artrite em camundongos SW. A cepa vacinal de *C. diphtheriae* PW8 é utilizada mundialmente na produção do toxóide diftérico pelo fato de ser considerada pouco invasora e altamente produtora de TD. No modelo experimental utilizado a cepa vacinal PW8 demonstrou potencial artritogênico semelhante a cepa tipo *C. diphtheriae* ATCC27010, indicando que a capacidade de produção de TD não influenciou na implantação dos quadros de infecção invasiva e no nível de atividade artritogênica das amostras.

Entretanto, diferenças mais acentuadas no potencial artritogênico de amostras de *C. diphtheriae* foram observadas quando avaliadas as amostras isoladas de sangue de pacientes com endocardite diftérica. Utilizamos três cepas invasoras de *C. diphtheriae* subsp. *mitis* (HC01/Brasil, HC02/1999/Brasil, HC03; sacarose-positivas) e uma de *C. diphtheriae* subsp. *gravis* (HCO4; sacarose-negativas) oriundas de isolados humanos na promoção de sinais clínicos de artrite em camundongos SW. As cepas de *C. diphtheriae* invasoras e desprovidas do *gene tox* (HC01, HC02, HC03 e HCO4) estudadas mostraram potencial artritogênico muito superior às demais cepas utilizadas no estudo, somente sendo comparadas as duas cepas de *C. ulcerans* 809 e CDC-KC279. As cepas HC01 e HCO4 apresentaram perfis estatisticamente semelhantes em um patamar mais elevado de atividade

artritogênica. Em um nível menor de potencial temos as cepas HC02 e HC03 igualmente com perfis estatisticamente semelhantes.

Os dados indicaram que *C. diphtheriae* apresentou potencial artritogênico cepa-dependente e que amostras invasoras foram capazes de exibir maior potencial artritogênico que as demais amostras estudadas neste estudo e as amostras atoxinogênicas anteriormente avaliadas por Puliti e colaboradores (2006), porém, independente dos biótipos *gravis* e *mitis* e da capacidade de metabolização de sacarose.

Ao contrário do descrito em diversos casos de infecções invasivas humanas pelo *C. diphtheriae* pertencentes aos biótipos *gravis* e *mitis* (PATEY et al., 1997, HIRATA Jr et al., 2008), não foi observado na literatura disponível casos descritos que apresentassem sinais e sintomas de artrite em humanos e/ou em animais infectados com *C. ulcerans*. O modelo murino utilizado em nosso estudo, que apresenta semelhanças com a doença humana, além de ter oferecido potencial para uma melhor compreensão de processos infecciosos causados pelo *C. ulcerans*, apresentou resultados que capazes de demonstrar potencial artritogênico para *C. ulcerans*. Estes dados poderão futuramente auxiliar aos clínicos a investigar sinais e sintomas de artrite em pacientes com infecção pelo *C. ulcerans*.

Com relação à porcentagem de camundongos afetados a cepa de *C. diphtheriae* invasiva com maior índice médio de artrite foi a HC04 com 92,45% dos animais apresentando algum sinal clínico de artrite. A semelhança do ocorrido com o índice médio de artrite, aqui também temos como a segunda cepa mais efetiva com 86,66% dos animais afetados a cepa HC01, seguida pela HC03 (78,57%) e a cepa HC02 novamente mostrando uma virulência inferior quando comparadas com os isolados de infecções invasivas utilizados no estudo com 50% dos camundongos afetados. Os dados demonstraram que as amostras invasoras exibem diferenças nos potenciais artritogênicos entre si.

A artrite séptica é uma inflamação de uma articulação causada por invasão bacteriana. Para colonização do tecido sinovial, o microrganismo deve ser dotado de propriedades específicas, deve ser transportável por tecido sinovial, invadindo fagócitos, demonstrando tropismo ou capacidade de se multiplicar no tecido sinovial. A partir daí, pode-se concluir que as características específicas desencadeantes de artrite no hospedeiro, bem como do patógeno devem coincidir (GAEDE; HEESEMANN, 1995).

Além da observação do desenvolvimento de artrite séptica foi realizado, ainda, o monitoramento da viabilidade bacteriana na corrente sanguínea e em diferentes órgãos. Semelhante a *C. diphtheriae* (PULITI et al., 2006), algumas cepas de *C. ulcerans* foram capazes de produzir infecção letal em camundongos. PULITI e colaboradores (2006) observaram taxas de letalidade semelhante para três cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae* isoladas de garganta dos pacientes com faringite grave usando camundongos CD1. Em nossos experimentos com camundongos convencionais SW indicou diferenças nas taxas de letalidade entre as cepas *C. ulcerans*. Além disso, a avaliação da morte de camundongos convencionais SW devido à infecção por $2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ de células viáveis de cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, foi demonstrado um maior potencial de letalidade para as cepas de *C. ulcerans*.

A cepa de *C. diphtheriae* isolada de endocardite (HC03) foi escolhida para a etapa de seleção da linhagem animal devido ao fato de nos estudos preliminares ter apresentado o maior potencial artrítogênico entre todas as cepas avaliadas. Em relação à etapa de seleção da linhagem de camundongos para o estudo, nos grupos que receberam tratamento, seja ele o vacinado pelo toxoide difterico ou o tratado com soro antidiférico, a linhagem Swiss Webster apresentou níveis artrítogênicos superiores e significativamente diferentes ($P = 0,0465$ e $P = 0,0446$, respectivamente) aos apresentados pelos camundongos NIH. Diferenças na susceptibilidade genética do desenvolvimento da artrite podem ocorrer entre diferentes linhagens de camundongos (BREMELL et al., 1991, PULITI et al., 2001). Durante a infecção via i.v. por *C. diphtheriae* ($2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) em camundongos CD-1, todas as amostras foram artrítogênicas resultando em um intervalo de 25% a 60% dos animais com lesões articulares moderadas ou severas (PULITI et al., 2006). Em nosso estudo, a infecção via i.v. por *C. diphtheriae* em camundongos convencionais SW resultou em 10% dos animais com lesões articulares para a cepa toxinogênica ATCC27012. Não foram observados sinais de artrite para o grupo de camundongos infectados pela cepa de *C. diphtheriae* atoxinogênica ATCC27010 e *C. ulcerans* BR-AD22. Infecções com as cepas de *C. ulcerans* CDC-KC279 e 809 resultaram em um máximo de 84,61% e 71,42%, respectivamente, de animais com lesões articulares.

Embora até o momento não tenha sido relatado na literatura casos de artrite séptica em seres humanos ou animais, devido à *C. ulcerans*, este modelo *in vivo*

demonstrou o maior potencial para artritogênico do *C. ulcerans*, quando comparado com algumas cepas de *C. diphtheriae*, independente da produção de TD.

Semelhante a muitos casos de artrite séptica causada por outros patógenos bacterianos (GOLDENBERG; REED, 1985), artrite por *C. ulcerans* também apresenta disseminação hematogênica. Diferente da espécie *S. aureus* que foi encontrado viável em amostras de sangue 28 dias após a infecção de camundongos (BREMELL et al., 1991), cepas de *C. diphtheriae* (PULITI et al., 2006) e de *C. ulcerans* foram registrados em amostras de sangue de camundongos em um máximo de seis e três dias, respectivamente. O isolamento de *S. aureus* (28 dias) (BREMELL et al., 1991), *C. diphtheriae* (> 15 dias) (PULITI et al., 2006) e *C. ulcerans* (4-6 dias) foi também registrado em tecidos não articulares. Como anteriormente observado para *C. diphtheriae* (PULITI et al., 2006), *C. ulcerans* foi isolado somente de rins e baço, mas não do coração e os pulmões de camundongos. Apesar do fato de que o *S. aureus* não ter sido recuperado a partir de articulações de 38% dos camundongos afetados (BREMELL et al., 1991), camundongos com artrite mostraram sinais de crescimento de *C. diphtheriae* nas articulações (PULITI et al., 2006) e *C. ulcerans* por até 20 dias em nossos experimentos. Portanto, a infecção por *C. ulcerans* em camundongos SW foi acompanhada pelo aparecimento de lesões articulares em um número significativo de animais.

As citocinas interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são mediadores importantes da resposta inflamatória. Muitos estudos têm destacado o importante papel das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α na patogênese da artrite reumatóide (ANDREAKOS et al., 2002; ISHIHARA; HIRANO, 2002). A expressão sérica dos níveis de IL-6 estão envolvidos no catabolismo dos componentes do tecido conjuntivo nos locais de inflamação (ITO et al., 1992) e ativa os osteoclastos (GREEN et al., 1994). Uma correlação direta entre a gravidade da artrite e os níveis de IL-6 e TNF- α tem sido demonstrado em um modelo do rato do grupo B Streptococcus artrite séptica (TISSI et al., 1999). A persistência de altos níveis de IL-6 e TNF- α também estão correlacionados com a gravidade da artrite séptica em murinos por *S. aureus* (NILSSON et al., 1999).

Há evidências de que para infecções causadas por cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae*, ocorre a indução de secreção local e sistêmica de IL-6 e TNF- α . Aqui, nós fornecemos a evidência de que todas as variedades examinadas de *C. ulcerans*

induzem a secreção sistêmica de IL-6 e TNF- α . De acordo com PULITI e colaboradores (2006) em artrite séptica induzida por *C. diphtheriae*, IL-6, também contribui ativamente para o dano articular, pois a severidade da artrite observada em camundongos infectados foi diretamente associada com níveis séricos de IL-6. Assim, podemos supor que na artrite séptica induzida por *C. ulcerans* a IL-6 dinamicamente trabalha em conjunto para dano articular, como nas infecções por cepas de *C. diphtheriae*. Quadros de infecções induzidas por cepas de *C. diphtheriae* expressam diferentes padrões de citocinas em ambos os níveis local e sistêmico, sugerindo que as diferenças poderiam ocorrer na estrutura da superfície celular do bacilo da difteria que, através da contratação de receptores celulares presentes em diferentes células do hospedeiro, possam tratar de uma produção de citocinas específicas (PULITI et al., 2006). Atualmente, as diferenças nos níveis sistêmicos de IL-6 e TNF- α não parecem estar relacionadas com o biótipo de *C. diphtheriae*.

Observamos que a expressão das citocinas IL-6 e TNF- α em soros de camundongos desafiados com algumas cepas, como a cepa CDC-E8392/EUA, e apesar de não tão expressivos, os picos de produção de ambas as citocinas podem ocorrer em fases mais tardias da infecção (ex. décimo segundo dia pós-infecção). Este dado reforçou o fato de que apesar da pouca capacidade de produzir artrite neste modelo, encontramos uma maior atividade também no décimo segundo dia pós-infecção confirmando os dados a semelhança do observado por Puliti e colaboradores (2006), que demonstrou entre os níveis séricos de IL-6 e TNF- α com o desenvolvimento de sinais clínicos de artrite em camundongos. Observamos uma forte correlação entre o índice da artrite *in vivo* e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A maioria das cepas estudadas induziu um pico de secreção de IL-6 e TNF- α nos primeiros cinco dias de infecção. Isto poderia ser explicado pela contratação rápida ou aguda de células da resposta imune inata, tais como neutrófilos e macrófagos, e conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α .

A artrite mais severa observada em camundongos infectados com cepas de *C. ulcerans* 809 e CDC-KC 279 está associada a níveis mais altos de IL-6 e TNF- α , enquanto a cepa BR-AD22, cuja infecção não resultou ocorrência de para artrite, foi também capaz de induzir a níveis sistêmicos mais elevados de IL-6 e TNF- α . Curiosamente, embora a cepa BR-AD22 seja atoxinogênica e não-artritogênica no

modelo empregado, esta cepa produziu níveis de IL-6 e TNF- α maiores do que os detectados em grupos de camundongos infectados com cepas de *C. diphtheriae* ATCC27010 e ATCC27012 que são levemente artritogênica e toxinogênica respectivamente.

Quanto a *C. ulcerans* foi observada forte correlação entre o índice de artrite e a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*. Os isolados bacterianos induzem um pico de secreção de IL-6 e TNF- α nos primeiros cinco dias de infecção. Isto poderia ser explicado pela mobilização rápida ou aguda de células da resposta imune inata, tais como neutrófilos e macrófagos, e conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α .

Níveis sistêmicos sustentados de IL-6 foram detectados em camundongos logo após a infecção, seguidos de um decréscimo gradual nos dias subseqüentes. No início, a produção de TNF- α também foi evidente, mas, diferentemente da IL-6, continuou a aumentar, atingindo concentração máxima no dia 3, e após este prazo diminui progressivamente. Em nossos experimentos os níveis de IL-6 mostraram uma tendência descendente até o vigésimo dia, enquanto o oposto ocorre com os níveis de TNF- α . No vigésimo dia, temos uma clara tendência ascendente, especialmente nos grupos infectados por cepas 809 e CDC-KC279, e em menor grau com a cepa ATCC27012.

Embora o *C. ulcerans* aparentemente tenha sido eliminado do sangue e de tecidos não-articulares na primeira semana, os microorganismos persistiram nas juntas por mais de três semanas. Esta infecção de longa duração foi observada em camundongos dependendo da cepa bacteriana utilizada. As diferenças também ficaram evidentes tanto em incidência e gravidade da artrite. Para algumas cepas de *C. ulcerans*, o exame histopatológico revelou uma artrite severa, com presença de células inflamatórias e de degradação óssea ou da cartilagem. Artrite grave não foi observada para as infecções causadas pelas cepas de *C. diphtheriae* utilizadas aqui ou no estudo anterior realizado por PULITI e colaboradores (2006).

PLD é o fator determinante de virulência mais importante identificado no *Corynebacterium pseudotuberculosis* ocasionando aumento da permeabilidade vascular, propriedades dermonecroticas e redução na viabilidade de neutrófilos e macrófagos. Portanto, podemos supor que as lesões dermonecroticas observadas na cauda e articulações com artrite de camundongos infectados com *C. ulcerans*

foram possivelmente favorecido pela produção de PLD feita por microrganismos cresceram nestes tecidos.

Em conjunto, estes resultados são a primeira demonstração que as cepas de *C. ulcerans* (809 e CDC-KC279) apresentam capacidade de induzir a artrite séptica em camundongos convencionais SW.

Finalmente, em todos os aspectos analisados neste estudo, as amostras de *C. ulcerans* demonstraram maiores fatores de virulência do que as cepas de *C. diphtheriae* independentemente da produção de TD ou PLD.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Além de quadros de infecção e de indivíduos portadores assintomáticos de *C. diphtheriae*, amostras de *C. ulcerans* podem ser encontradas causando infecções humanas assim como em populações de caninos assintomáticos mantidos em abrigos de animais domésticos localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro. O fato de termos achado um animal portador de *C. ulcerans* em uma pequena pesquisa de portadores com 60 animais chama a atenção para a provável ampla circulação deste patógeno em nosso país.
- Ao contrário do observado nos demais modelos animais avaliados, o modelo de artrite em camundongos convencionais Swiss Webster, via inoculação endovenosa, se mostrou prático e exequível na estimativa da capacidade de *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* promover infecções invasivas.
- As amostras estudadas apresentaram potencial invasor em níveis variados, conforme observado através da utilização do modelo experimental in vivo de artrite em murinos;
- As amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* estudadas apresentaram potencial artritogênico em intensidades variadas, independente da presença do gene tox. As profilaxias disponíveis (vacinação e soroterapia) baseadas exclusivamente na toxina diftérica aparentemente não interferiram no processo infeccioso avaliado neste estudo;
- Amostras *C. diphtheriae* isoladas de casos de endocardite e de *C. ulcerans* isoladas de processos infecciosos em humanos e animais apresentaram maior potencial artritogênico (> 50%) quando comparadas com aquelas de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* isoladas de quadros de difteria clássica e de cão assintomático, respectivamente;
- A análise histopatológica demonstrou a presença de edema subcutâneo, infiltrado inflamatório, danos ao tecido ósseo e hipertrofia de sinoviócitos, compatível com quadro de artrite severa para as amostras consideradas mais artritogênicas;

- Bactérias viáveis foram recuperadas a partir do sangue, rins, fígado, baço e articulações. Ambas as espécies apresentaram quadros de poliartrite, sendo que os punhos e tornozelos foram as áreas mais frequentemente acometidas;
- As amostras de *C. ulcerans* 809 e CDC-KC279, além dos quadros de poliartrite, apresentaram lesões articulares ulceradas e nodose na cauda com extensa necrose no sítio da inoculação (veia caudal);
- Níveis sistêmicos de citocinas IL-6 e TNF- α foram aumentados pós infecção por ambas as espécies. A correlação entre o índice da artrite e os níveis sistêmicos de citocinas IL-6 e TNF- α foi observada para as cepas de *C. ulcerans*, com exceção da cepa BR-AD22 incapaz de produzir artrite.
- Foi demonstrado potencial artritogênico cepa-dependente para *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* indicando diferenças na virulência e no potencial invasor destas espécies e independentes da capacidade de produção de toxina diftérica e de PLD.
- O *C. ulcerans* parece circular entre hospedeiros humanos e animais em nosso país e em todos os aspectos de virulência abordados neste estudo (letalidade, potencial artritogênico, capacidade de invasão a tecidos e órgãos, lesões histopatológicas e indução a expressão de citocinas IL-6 e TNF- α em camundongos), este patógeno apresentou níveis semelhantes aos apresentados pelas cepas invasoras de *C. diphtheriae* e níveis expressivamente superiores aos apresentados pelas cepas de *C. diphtheriae* isoladas de quadros de difteria clássica utilizadas no estudo.

REFERÊNCIAS

- AARON, L.; HEURTEBISE, F.; BACHELIER, M.N.; GUIMARD, Y. Pseudomembranous diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*. **La Rev. Méd. Int.**, v. 27, p.333-335, 2006.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p.403–410, 1990.
- ANDREAKOS, E. et al. Cytokines and anticytokine biologicals in autoimmunity: present and future. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 299–313, 2002.
- BARRET, N.J. Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales. **J. Infect.**, v. 12, p. 265-272, 1986.
- BELKO, J.; WESSEL, D.L.; MALLEY R. Endocarditis caused by *Corynebacterium diphtheriae*: case reported and review of the literature. **Ped. Infect. Dis. J.**, v.19, p. 159-163, 2000.
- BELSEY, M.A.; Le BLANC, D.R. Skin infections and the epidemiology of diphtheria: acquisition and persistence of *Corynebacterium diphtheriae* infections. **Amer. J. Epidemiol.**, v. 102, p. 179-183, 1975.
- BELSEY, M.A. et al. *Corynebacterium diphtheriae* skin infections in Alabama and Louisiana, a factor in the epidemiology of diphtheria. **Engl. J. Med.**, v. 280, p.135-144, 1969.
- BERGIN, I.L. et al. Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic implants in macaques. **Comp. Méd.**, v.50, p.530-535, 2000.
- BERTUCCINI, L.; BALDASSARRI, L.; von HUNOLSTEIN, C. Internalization of non-toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v.37, p.111-118, 2004.
- BIERNE, H.; COSSART, P. InIB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasins and a growth factor. **J. Cell. Sci.**, v.1, p.3357-3367, 2002.
- BITRAGUNTA, S. et al. Safety and immunogenicity of single dose of tetanus–diphtheria (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus, Hyderabad, India, 2007. **Vaccine**, v. 28, p.5934-5938, 2010.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – **Evolução Temporal das Doenças de Notificação Compulsória no Brasil de 1980 a 1998**. Ministério da saúde, 1999. Disponível na URL: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epi_edicao_especial.pdf. Acessado em: 10 nov 2010.
- BONMARIN, I et al. Diphtheria: a zoonotic disease in France? **Vaccine**, v. 27, p.4196-4200, 2009.

BONNET, J.M.; BEGG, N.T. Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control. **Commun. Dis. Pub. Health**, v. 2, p.242-249, 1999.

BOSTOCK, A.D. et al. *Corynebacterium ulcerans* infection associated with untreated milk. **J. Infect.**, v. 9, p.286-288, 1984.

BOWMAN, C.G.; IMHOFF, J.G.; BONVENTRE, P.F. Specificity of Diphtheria toxin action on heart and muscle tissue of guinea pigs. **Infect. Immun.**, v. 2, p.686-688, 1970.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis. **Informe Sobre a Difteria no Brasil: Alerta Sobre o Cenário Atual. 2010; Nota Técnica**. Disponível Na Url: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1481. Acessado em: 17 nov 2010.

BRASIL. Portaria nº 175, de 11 de novembro de 1996. Estabelece Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade das Vacinas: Tríplice Bacteriana, Toxóide Tetânico, Dupla Adulto e Dupla Infantil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de nov. 1996.

BREMELL, T. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis in mice. **Infect. Immun.** v.59, n.8, p.2615-2623, 1991.

CARDENAS, R. et al. *Corynebacterium diphtheriae*: características de cepas aisladas recientemente em Maracaibo-Venezuela. **Kasmera**, v.4, p. 185-198, 1972.

CARPENTIER, J.P. et al. Nasopharyngeal *Corynebacterium ulcerans*: a different diphtheria. **J. Laryng. Otol.** v.106, p.824-826, 1992.

CASSIDAY, P.K. et al. Analysis of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains revealing potential for false-negative real-time PCR results. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p.331-333, 2008.

CAVUS, S.A.; OGUZ, V.A.; YUCE, A. The seroprevalence of diphtheria among adults in Izmir-Turkey. **Vaccine**, v.25, p.3851-3854, 2007.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Respiratory diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*-Terre Haute, Indiana, 1996. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.46, p.330-332, 1997.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Three cases of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection. **Commun. Dis. Rep. CDR. Wkly.**, v.10, p.49-52, 2000.

CHHATTWAL, G.S. Anchorless adhesions and invasions of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 205-208, 2002.

CLARIDGE, J.E.; SPRIGEL, C.A. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix* and *Gardnerella*. In: MURRAY, P.R.; BARON,

E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Ed.). Manual of Clinical Microbiological. Washington DC: **American Society for Microbiology Press**, p. 357-373, 1995.

COLOMBO, A.V. et al. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.197, p.235-239, 2001.

COYLE, M.B. et al. Erythromycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesions. **Antimicrob. Agents Chem.**, v.16, p.525-527, 1979.

DAMASCO, P.F. et al. Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro. **Epidemiol. Infect.**, v.133, p. 911-914, 2005.

DAVIDSON, S.; ROTEM, Y.; BOGKOWSKI, B.; RUBINSTEIN, E. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis. **Am. J. Med. Sci.**, v. 271, p. 351-353, 1976.

DESSAU, R.B.; BRANDT-CHRISTENSEN, M.; JENSEN, O.J.; TONNESEN, P. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. **Eur. Respir.**, v. 8, p.651-653, 1995.

DEWINTER, L.M.; BERNARD, K.A.; ROMNEY, M.G. 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.**, v.43, p.3447-3449, 2005.

DE ZOYSA, A. et al. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.4377-4381, 2005.

DINELLI, M.I.S.; FISBERG, M.; DE MORAES-PINTO, M.I. Tetanus and diphtheria immunity in adolescents from São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.40, p. 259-263, 2007.

DITTMAN, S. et al. Successful control of epidemic diphtheria in the State of former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.S10-S20, 2000.

DIVINO-GOES, K.G. et al. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.40, p.1681-1687, 2007.

DIXON, J.M.S. Diphtheria in North America. **J. Hyg. Camb.**, v.93, p. 419-432, 1984.

DURBACĂ, S. Antitetanus and antidiphtheria immunity in newborns. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.**, v. 58, p.267-272, 1999.

DZUPOVA, O. et al. An unusual course of invasive infection due to nontoxinogenic strain of *Corynebacterium diphtheriae*. **Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.**, v.11, p.222-225, 2005.

EFSTRATIOU, A et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.3173-3177, 1998.

EFSTRATIOU, A. et al. Current Approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.S138-S145, 2000.

EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. World Health Organization. **Commun.Dis. Public Health**, v.2, p.250-257, 1999.

ELDEN, S. et al. Laboratory-confirmed case of toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Euro Surveill.**, E070329, 2007.

FARIZO, K.M. et al. Fatal respiratory disease due to *Corynebacterium diphtheriae*: case report and review of guidelines for management, investigation and control. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p.59-68, 1993.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenecity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 136-169, 1997.

FORMIGA, L.C.D. New possibilities for laboratory procedures for diagnosis. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 29, p. 93-96, 1985a.

FORMIGA, L.C.D. Difteria: enfoque microbiológico e epidemiológico. Importância das lesões cutâneas e novas possibilidades de diagnóstico. **Ann. Bras. Dermat.**, v. 60, p. 333-338, 1985b

FORMIGA, L.C.D. Diagnostico microbiológico da difteria. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 22, p. 52-58, 1986.

FORMIGA, L.C.D; MATTOS-GUARALDI, A.L. Diphtheriae: current status and laboratory procedures for diagnosis. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 29, p. 93-96, 1993.

FOSTER, G. et al. *Corynebacterium ulcerans* in free-ranging otters. **Vet. Rec.**, v.150, p.524, 2002.

FOX, J.G. & FROST, W.W. *Corynebacterium ulcerans* mastitis in a bonnet macaque (*Macaca radiata*). **Lab. Anim. Sci.**, v.24, p.820-822, 1974.

FUNASA. **Difteria: situação atual da doença**. Disponível na URL: http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/difteria/index.htm . Acessado em: 23 mar 2002.

FUNKE, G. & BERNARD, K.A. Coryneform Gram-positive rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JA, Landry ML, Pfaller MA (eds). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC: American Society for Microbiology Press, p.485-514, 2007.

FUNKE, G. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clin. Microbiol.**, v.10, p. 125-129, Rev. 1997.

GAEDE, K.I. & HEESEMANN, J. Arthritogenicity of genetically manipulated *Yersinia enterocolitica* serotype O8 for Lewis rats. **Infect. Immun.** v.63, n. 2, p.714-719, 1995.

GALAZKA, A.M. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p.S2-S9, 2000.

GALAZKA, A.M.; ROBERTSON, S.E. Diphtheria: changing patterns in the world and the industrialized world. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 11, p. 107-117, 1995.

GILBERT, R. & STEWART, F.C. *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheriae*. **J. Lab. Clin. Med.**, v.12, p.756-761, 1926.

GLADIN, D.P. et al. Sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Saint Petersburg to antibacterial drugs. **Antibiot. Khimioter.**, v.44, p.17-21, 1999.

GOLAZ, A. et al. Epidemic diphtheria in the newly independent states of the former Soviet Union: implications for diphtheria control in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p.237-243, 2000.

GOLDENBERG, D.L. & REED J.I. Bacterial arthritis. **N. Eng. J. Med.** v.312, p.764-771, 1985.

GOMES, D.L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **J. Med. Microbiol.**, v.58, p.1419-1422, 2009.

GREEN, J. The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. **Miner. Electrolyte Metab.** v.20, p.7-15. Review, 1994.

GROMAN, N.; SCHILLER, J.; RUSSELL, J. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from coryneophage beta and *Corynebacterium diphtheriae*. **Infect. Immun.**, v. 45, p.511-517, 1984.

GRUNER, E. et al. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from intravenous drugs users. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 94-96, 1994.

GUBLER, J.G. et al. Classical pseudomembranous diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, v. 120, p.1812-1816, 1990.

GUIA BRASILEIRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA/Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Difteria. **Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos. Capítulo 5.6**; 1998. Disponível na URL: <http://www.cro-rj.org/biosseguranca/Guia de%20Vigilancia Epidemiologica.pdf>. Acessado em: 10 mar 2010.

GUIZO, N. et al. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection I. Prediction of protection in humans infants by acellular vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 2366-76, 1999.

HADFIELD, T.L. et al. The pathology of diphtheria. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.S116–120, 2000.

HALIOUA, B. et al. Diphtérie cutanée chez un patient infecté par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). **Ann. Dermatol. Venerea**. v. 18, p. 874-77, 1992.

HALL, A.J. et al. Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, p.688-689, 2010.

HARD, G.C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, v.12, p.1439-1449, 1975.

HART, J. Zoonosis training day: *Corynebacterium ulcerans* in a patient with diphtheria and two dogs. **Health Protection Agency**. Disponível em: http://www.northwest-zoonoses.info/writedir/Presentation_Judy_Hart.pdf. Publicado em 25/6/2010. Acessado em: 10 nov. 2010.

HART, R.J.C. *Corynebacterium ulcerans* in humans and cattle in North Devon. **J. of Hyg.**, v. 92, p.161-164, 1984.

HATANAKA, A. et al. *Corynebacterium ulcerans* Diphtheria in Japan. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 752-753, 2003.

HENRIKSEN, S.D. Some bacteriophages of *Corynebacterium ulcerans* and their lack of effect on toxigenicity. **Acta Pathol.Microbiol.Scand.**, v. 37, p.65-70, 1955.

HERAIEF, E.; GLAUSER, M.P.; FREEDMAN, L.R. Natural history of aortic valve endocarditis in rats. **Infect. Immun.**, v. 37, p.127-31, 1982.

HIGGS, T.M.; SMITH, A.; CLEVERLY, L.M.; NEAVE, F.K. *Corynebacterium ulcerans* infections in a dairy herd. **Vet. Rec.**, v. 81, p.34-35, 1967.

HIRATA, Jr. R. et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 21, p. 115-119, 2002.

HIRATA, Jr. R. et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.41, p.986-991, 2008.

HIRATA, Jr. R. et al. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Microb. Pathog.**, v.36, n. 3, p.125-130, 2004.

HODGSON, A.L. et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect. Immun.**, v.60, p.2900-2905, 1992.

HOGG, R.A. et al. Possible zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from companion animals in a human case of fatal diphtheria. **Vet. Rec.**, v.165, p.691-692, 2009.

HOMMEZ, J. et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.954-957, 1999.

HONMA, Y.; NAKASONE, N. Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization and biological role. **Microbiol. Immun.**, v.34, p.83-98, 1989.

HONMA, Y. et al. A case of afebrile pneumonia caused by non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 62, p. 327-329, 2009.

HUST, M.H et al. Toxische diphtherie durch *Corynebacterium ulcerans*. **D.M.W.**, v.119, p.548-552, 1994.

IMATAKA, K. et al. A new model for infective endocarditis of the mitral valve in rabbits. **Am. Heart J.**, v.125, p.1353-1357, 1993.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 357–368, 2002.

ITO, A. et al. Effects of interleukin-6 on the metabolism of connective tissue components in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.** v.35, n. 10, p.1197-201, 1992.

KANUNGO, R. et al. Diphtheria due to non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: A report of two cases. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 20, p. 50-52, 2002.

KATSUKAWA, C. et al. Toxicogenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from the domestic dog for the first time in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.62, p.171-172, 2009.

KAUFMANN, D.; OTT, P.; RUEGG, C. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. **Infection**, v. 30, p.168-170, 2002.

KHAMIS, A.; RAOULT, D; SCOLA, L.B. Rpo B gene sequencing for identification for *Corynebacterium* species. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 3925-31, 2004.

KHAN, N.; SHASTRI, J.; ARGAL, U.; DOCTOR, B. Resurgence of diphtheria in the vaccination era. **Indian J. Med. Microbiol.**, v.25, p. 434, 2007.

KIMURA, Y. et al. Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. **Clin. Exp. Nephrol.**, DOI 10.1007/s10157-010-0346-4, 2010.

KISELY, S.R.; PRICE, S.; WARD, T. *Corynebacterium ulcerans*: a potential cause of diphtheria. **Commun. Dis. Rep. CDR. Rev.**, v. 4, p. 63-64, 1994.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesions: function and structure. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 27-35, 2000.

KOMIYA, T. et al. Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: Ribotype, toxigenicity, and serum antitoxin titre. **J. Med. Microbiol.**, v.59, p.1497-1504, 2010.

KOOPMAN, J.S.; CAMPBELL, J. The role of cutaneous diphtheria infections in a diphtheria epidemic. **J. Infect. Dis.** v.171, p. 239-244, 1975.

LARTIGUE, M.F. et al. *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.999-1001, 2005.

LEEK, M.D. et al. Diphtheria with a difference--a rare corynebacterium fatality with associated apoptotic cell death. **Histopathology**, v.16, p.187-189, 1990.

LEGETT, B.A. et al. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. **Vet. Rec.**, v.166, p.656-657, 2010.

LEWENA, S. Infective endocarditis: Experience of a paediatric emergency department. **J. Paed. Child Health**, v.41, p.269-72, 2005.

MacGREGOR, R.R.C. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Mandrell DL, Douglas RG, Bennet JE (Eds). *Enfermidades Infecciosas. Principios y Prática II*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panam., 1990.

MacQUEEN, S. Diphtheria: a changing pattern. **Nursing Times**, v. 93, p. 57-62, 1997.

MAN, P. et al. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. **FEBS. J.**, v.277, p.653-662, 2010.

MANUAL DA QUALIDADE. Boas práticas em experimentação animal. In: **Manual da qualidade**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz - (65.3440.002), 2010.

MAP, DIPHTHERIA WORLD – WHO 2002. DISPONÍVEL NA URL: http://en.wikipedia.org/wiki/file:diphtheria_world_map_-_daly_-_who2002.svg. ACESSADO EM: 15 NOV. 2010.

MARQUEZI, D. Algo novo no reino dos humanos. **Rev. Galileu**. Ed Globo, v. 197, p.41-53, 2007.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. Bacterial properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. **Curr. Microbiol.**, v. 37, p. 156-158, 1998.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. *Corynebacterium diphtheriae* e difteróides: ensaios de aderência. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 27, p. 53-60, 1991a.

MATTOS-GUARALDI A.L.; FORMIGA L.C.D. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 399-406, 1991b.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; ANDRADE, A.F. Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.168, p.167-172, 1998.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 236-239, 2001.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; PEREIRA, G.A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1507-1512, 2000.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p.987-993, 2003.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in human with pulmonary infection in Rio De Janeiro metropolitan area, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, p.396-400, 2008.

MAY, B.D. *Corynebacterium ulcerans* infections in monkeys. **Lab. Anim. Sci.**, v. 22, p.509-513, 1972.

MCNAMARA, P.J.; CUEVAS, W.A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. **Gene**, v.14, p.156:113-118, 1995.

MILLAR, B.C. & MOORE, J.E. Emerging issues in infective endocarditis. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.1110-1116, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica- 6ª edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/difteria_gve.pdf>. Acessado em: 20 out. 2010.

MOREIRA, L.O. et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p.5907-5913, 2003.

MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; CIPOLLA, A.L. Pyogranulomatous meningoencephalitis in a goat due to *Corynebacterium ulcerans*. **Vet. Rec.**, v. 56, p.317-318, 2005.

MURAKAMI, H. et al. Endemic diphtheria in Ho Chi Minh City; VietNam: A matched case-control study to identify risk factors of incidence. **Vaccine**, v. 29/28, n. 51, p. 8141-8146, 2010.

NAKAO, H.; POPOVIC, T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. **J. Clin. Microbiol.**, v, 35, p.1651-1655, 1997.

NAKAO, H. et al. 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.**, v.34, p. 1711-1716, 1996.

NEAL, S.E.; EFSTRATIOU, A., on behalf of DIPNET and International Diphtheria Reference Laboratories. International External Quality Assurance for laboratory Diagnosis of Diphtheria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 4037-4042, 2009.

NIELSEN, P.B. et al. Diphtheria in Denmark 1956-1989. Occurrence of *Corynebacterium diphtheriae* and other diphtheria toxigenic bacteria. **Ugeskr Laeger**, v. 153, p.769-772 1991.

NIEMANN, H.H.; SCHUBERT, W.D.; HEINZ, D.W. Adhesin and invasion of pathogenic bacteria: a structural view. **Microbiol. Infect.**, v. 6, p. 101-112, 2004.

NIETFELD, J.J. et al. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, v.33, n. 11, p.1695-701, 1990.

NILSSON, N. et al. Protective role of NK1.1+ cells in experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. **Clin. Exp. Immunol.** v.117(1), p.63-69, 1999.

NUREKI, S. et al. *Corynebacterium ulcerans* infection of the lung mimicking the histology of Churg-Strauss syndrome. **Chest.**, v. 131, p.1237-1239, 2007.

ÖLANDER, R.M. et al. High tetanus and diphtheria antitoxin concentrations in Finnish adults--time for new booster recommendations? **Vaccine**, v. 27, p.5295-5298, 2009.

OLSON, M.E.; GOEMANS, I.; BOLINGBROKE, D.; LUNDBERG, S. Gangrenous dermatitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in Richardson ground squirrels. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, p.367-368, 1988.

OTT, L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion associated protein (DIP1281) is involved in cell-surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. **B.M.C. Microbiol.**, v.10, p.2, doi: 10.1186/1471-2180-10-2, 2010.

PACHECO, L.G. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p.480-486, 2007.

PALLEN, M.J. et al. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.353-356, 1994.

PANAITESCU, M. et al. Respiratory pathogens in non-human primates with special reference to *Corynebacterium ulcerans*. **Lab. Anim.**, v. 11, p.155-157, 1977.

PAPPENHEIMER, A.M. The story of a toxic protein 1888-1992. **Protein Sci.**, v. 2, p. 292-298, 1993.

PAPPENHEIMER, A.M. & MURPHY, J.R. Studies of the molecular epidemiology of diphtheria. **Lancet**, v. II, p. 923-926, 1983.

PATEY, O. & DELLION, S. Diphtheria and infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* in 1997. **Rev. Med. Interne.** v. 20, p. 39-49, 1999.

PEREIRA, G.A. Aspectos fenotípicos e genotípicos de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Brasil [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2001.

PEREZ, G. et al. J. In vivo activity of amoxicillin in a non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* rabbit endocarditis experimental model. **Pathologie Biologie.** v. 50, p. 513-515, 2002.

PERS, C. Infection due to "*Corynebacterium ulcerans*", producing diphtheria toxin-a case report from Denmark. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B.**, v. 95, p.361-362, 1987.

PESAVENTO, P.A. et al. Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats. **Vet. Pathol.**, v. 44, p.218-221, 2007.

PIMENTA, F.P. et al. Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 459-462, 2006.

PIMENTA, F.P. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. **J. Med. Microbiol.**, v.57, p.1438-1439, 2008a.

PIMENTA, F.P.; MATIAS, G.A.; PEREIRA, G.A.; CAMELLO, T.C.; ALVES, G.B.; ROSA, A.C.; HIRATA, Jr. R.; MATTOS-GUARALDI, A.L. A PCR for dtxR gene: application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Mol. Cell. Probes**, v. 22, p.189-192, 2008b.

PIMENTA, F.P. et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.46, p.307-311, 2008c.

POPOVIC, T. et al. Molecular epidemiology of diphtheria in Russia, 1985-1994. **J. Infect. Dis.**, v.174, p.1064-1072, 1996.

POPOVIC, T. et al. Molecular epidemiology of diphtheria. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.168-177, 2000.

PULITI, M. et al. Severity of group B streptococcal arthritis in selected strains of laboratory mice. **Infect. Immun.**, v.69(1), p.551-5, 2001.

PULITI, M. et al. Experimental model of infection with non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 229-235, 2006.

QUÉ, Y. et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. **J.E.M.**, v. 10, p. 1627-1635, 2005.

REACHER, M. et al. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*: an emerging pathogen in England and Wales? **Emerg. Infect. Dis.** v.6, p.640-645, 2000.

RIEGEL, P. et al. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 26, p.271-276, 1995.

SABBADINI, P.S. Participação de proteínas 67-72kDa de superfície celular em processos de aderência e internalização de *Corynebacterium diphtheriae*. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

SAIKYA, L. et al. Diphtheria outbreak in Assam, India. **South Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.41, p.647-652, 2010.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Diphtheria. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, p. 113-121, 1994.

SANTOS, L.S. et al. Perfis fenotípicos e genotípicos de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas em recente surto epidêmico ocorrido no Maranhão. In: 44º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, Rio de Janeiro. **J. Bras. Patol.Clín.**, n. 26, 2010.

SCHUHEGGER, R. et al. Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.15, p.1314-1315, 2009.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - SESRJ. **Proporção de casos e óbitos por difteria segundo faixa etária, 1978-2002**. Rio de Janeiro: SES-RJ/SUSC/CE/Assessoria de Doenças Imunoprevisíveis; 2002.

SETO, Y. et al. Properties of Coryneophage attachment Site and Molecular Epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* Isolated from Humans and Animals in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.61, p. 116-122, 2008

SIEGEL, S.M.; HAILE, C.A. *Corynebacterium ulcerans* pneumonia. **South Med. J.**, v.78, p.1267, 1985.

SIMONSEN, O. et al. Revaccination of adults against diphtheria ii: combined diphtheria and tetanus revaccination with different doses of diphtheria toxoid 20 years after primary vaccination. **A.P.M.I.S.**, v.94, p.219-226, 1986.

SING, A.; BIERSCHENK, S.; HEESEMANN, J. Classical diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: amino acid sequence differences between diphtheria toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. **Clin. Infect. Dis.**, v.15, n. 40, p.325-326, 2005.

SING, A. et al. 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.**, v.41, p.4848-4851, 2003.

SINGH, J. et al. Diphtheria is declining but continues to kill many children: analysis of data from a sentinel center in Delhi. **Epidemiol. Infect.**, v. 123, p. 209-215, 1999.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO/ **Ministério da Saúde – SINAN/MS; 2007**. Disponível na URL:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_difteria.pdf. Acessado em:10 março 2010.

SOUZA, S.M.S.; et al. Influence of stannous chloride on the adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Int. J. Mol. Med.**, v.12, p.657-661, 2003.

SPERANZA, F.A.B. et al Diphtheria toxin IgG levels in military and civilian blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.43, p.120-123, 2010.

STINS, M.F.; BADGER, J.; KIM, K.S. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. **Microb.Pathog.**, v.30, p. 19-28, 2001.

SYKES, J.E. et al. *Corynebacterium ulcerans* bronchopneumonia in a dog. **J. Vet. Intern.Med.**, v. 24, p. 973-976, 2010.

TAYLOR, D.J.; EFSTRATIOU, A.; REILLY, W.J. Diphtheria toxin production by *Corynebacterium ulcerans* from cats. **Vet. Rec.**, v.150, p.355, 2002.

TAYLOR, J. et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in a veterinary student in London, United Kingdom, **Euro. Surveill.** Disponível em : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle>. Acessado em: 10 out. 2010.

TEJEDOR, M.T, et al. Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. **Can. Vet. J.**, v. 41, p.126-127, 2000.

TILEY, S.M et al. Infective endocarditis due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*: report of seven cases and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 271-275, 1993.

TISSI, L.; PULITI, M.; BARLUZZI, R.; OREFICI, G.; VON HUNOLSTEIN, C.; BISTONI, F. Role of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1b, and interleukin-6 in a mouse model of group B streptococcal arthritis. **Infect. Immun.** v.67, p.4545–4550, 1999.

TIWARI, T.S. et al. Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p.395-401, 2008.

- VALE, M.D. Interação com células epiteliais linhagem HEp-2 de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* isoladas de quadros de pneumonia fatal [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.
- VAN DAM, A.P. et al. A case of diphtheriae in the Netherlands due to an infection with *Corynebacterium ulcerans*. **Ned. Tijdschr. Geneeskd.**, v. 35, p. 311-313, 2003.
- VERA, AL. et al. Úlceras leishmanióticas cutâneas com presença de *Corynebacterium diphtheriae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 233-237, 2001.
- VERA, A.L. et al. Avaliação da influencia da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 233-237, 2001.
- VERTIEV, Y. et al. Purification and some properties of exotoxin from *Corynebacterium ulcerans* strain ATCC 9015. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol. Hyg.**, v.249, p.527-537, 1981.
- VITEK, C.R., WHARTON, M. Diphtheria in the former Sovietic Union: reemergence of a pandemic disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 539-549, 1998.
- VON HUNOLSTEIN, C. et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p.181-188, 2003.
- WAGNER, K.S. et al. Members of the Diphtheria Surveillance Network (DIPNET) and 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.** doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03269.x.2010
- WAGNER, J. et al. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p. 1598-1600, 2001.
- WANG, J; LONDON, E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. **Biochemistry**, v.48, p.10446-10456, 2009.
- WELLINGHAUSEN, N. et al. A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.292, p.59-63, 2002.
- WONG, TP; GROMAN, N. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.43, p. 1114-1116, 1984.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Auxílios diretamente concedidos ao projeto

Edital MCT/CNPq 15/2007 – Universal – Processo n° 481124/2007-1
“Avaliação de modelos animais experimentos no desenvolvimento de doenças infecciosas imunopreviníveis do trato respiratório humano reemergentes no Brasil”.

Edital Papes/Fiocruz – Papes V (APQ) – Processo n° 403626/2008-0
“Avaliação de modelos animais experimentais no desenvolvimento de doenças invasivas por amostras toxigênicas e atoxigênicas de *Corynebacterium diphtheriae*”.

Apoio Técnico

Programa de Bolsas de Técnico/Tecnologista Fiocruz/Faperj – concessão de bolsa CT5 a Feliciano Correa Silva Junior para atuação no projeto “Avaliação de modelos animais experimentais no desenvolvimento de doenças invasivas por amostras toxigênicas e atoxigênicas de *Corynebacterium diphtheriae*” sob a orientação de Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias.

APÊNDICE B – Trabalhos Submetidos Relacionados Diretamente com a Tese

A.A.S.O. DIAS, L.S. SANTOS, P.S. SABBADINI, C.S. SANTOS, F.C. SILVA JR, F. NAPOLEÃO, P.E. NAGAO, M.H.S. VILLAS-BÔAS, R. HIRATA Jr, A.L. MATTOS-GUARALDI. Difteria pelo *Corynebacterium ulcerans*: uma zoonose emergente no Brasil e no mundo. ARTIGO DE REVISÃO. Submetido a Revista de Saúde Pública em 28-11-2010.

A.A.S.O. DIAS, F.C. SILVA JR, P.S. SABBADINI, L.S. SANTOS, M.M. RIBEIRO-CARVALHO, C.S. SANTOS, A.A. FILARDY, R. HIRATA Jr, M.H.S. VILLAS-BÔAS, A.L. MATTOS-GUARALDI. Strain dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. Submetido a Revista Veterinary microbiology.

ARTIGO DE REVISÃO

Difteria pelo *Corynebacterium ulcerans*: uma zoonose emergente no Brasil e no mundo

Diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*: the emergence of a worldwide zoonotic disease in Brazil

A.A.S.O. DIAS^{1,2}, L.S. SANTOS², P.S. SABBADINI², C.S. SANTOS², F.C. SILVA JR¹, F. NAPOLEÃO^{2,3}, P.E. NAGAO², M.H.S. VILLAS-BÓAS¹, R. HIRATA JR², A.L. MATTOS-GUARALDI²✉

¹Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ, ²Laboratório de Difteria e Corinebáctérias de Importância Clínica (LDCIC)-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ³Laboratório Central Noel Nutels-LACEN-SESDEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Título resumido: Difteria zoonótica pelo *C. ulcerans* no Brasil

✉: Profa. Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi
Laboratório de Difteria e Corinebáctérias de Importância Clínica -LDCIC. Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas-UERJ. Avenida 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brasil. CEP: 20 551-030.
Fax: +55 21 2587-6476 E-mail: guaraldi@uerj.br

Title page

**Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic
pathogen *Corynebacterium ulcerans***

A.A.S.O. DIAS¹, F.C. SILVA JR¹, L.S. SANTOS², M.M. RIBEIRO-CARVALHO²,
P.S. SABBADINI², C.S. SANTOS², A.A. FILARDY³, A. MYIOSHI⁴, V.A.
AZEVEDO⁴, R. HIRATA Jr², M.H.S. VILLAS-BÔAS¹, A.L. MATTOS-GUARALDI² ✉

Author affiliations: ¹Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz (Alexandre A.S.O. Dias, Feliciano C. Silva Júnior, Maria H.S.Villas Bôas); ²Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (Louisy Sanches dos Santos, Marilza M. Ribeiro-Carvalho, Priscila S. Sabbadini, Cíntia S. Santos, Raphael Hirata Júnior, Ana L. Mattos-Guaraldi); ³Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (Alessandra Filardy); ⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil (Anderson Myioshi, Vasco A. Azevedo).

Running Title: Septic arthritis due to *C. ulcerans*

Key words: *Corynebacterium ulcerans*, septic arthritis, murine model

✉ Address for correspondence: Dr AL Mattos-Guaraldi, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. CEP: 20 551-030.
Fax number: (+55) 21 2587-6476 E-mail: guaraldi@uerj.br

APÊNDICE C – Artigos completos publicados relacionados ao tema

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2010) 43: 460-466
ISSN 0100-879X

Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin

D.V. Nascimento^{1,4}, E.M.B. Lemes¹, J.L.S. Queiroz¹, J.G. Silva Jr.¹,
H.J. Nascimento¹, E.D. Silva¹, R. Hirata Jr.⁴, A.A.S.O. Dias³, C.S. Santos⁴,
G.M.B. Pereira^{2,4}, A.L. Mattos-Guaraldi⁴ and G.R.G. Armoa²

¹Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, ²Instituto Oswaldo Cruz,
³Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
⁴Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

The construction of a hexahistidine-tagged version of the B fragment of diphtheria toxin (DTB) represents an important step in the study of the biological properties of DTB because it will permit the production of pure recombinant DTB (rDTB) in less time and with higher yields than currently available. In the present study, the genomic DNA of the *Corynebacterium diphtheriae* Park Williams 8 (PW8) vaccine strain was used as a template for PCR amplification of the *dtb* gene. After amplification, the *dtb* gene was cloned and expressed in competent *Escherichia coli* M15™ cells using the expression vector pQE-30™. The lysate obtained from transformed *E. coli* cells containing the rDTB_{PW8} was clarified by centrifugation and purified by affinity chromatography. The homogeneity of the purified rDTB_{PW8} was confirmed by immunoblotting using mouse polyclonal anti-diphtheria toxoid antibodies and the immune response induced in animals with rDTB_{PW8} was evaluated by ELISA and demonecrotic neutralization assays. The main result of the present study was an alternative and accessible method for the expression and purification of immunogenically reactive rDTB_{PW8} using commercially available systems. Data also provided preliminary evidence that rabbits immunized with rDTB_{PW8} are able to mount a neutralizing response against the challenge with toxigenic *C. diphtheriae*.

Key words: Fragment B; Diphtheria toxin; Diphtheria; *dtb* gene; *E. coli* gene expression; Immobilized metal affinity

Fibrinogen binds to nontoxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains

Priscila Soares Sabbadini¹, Marcia Rocha Novais Genovez¹, Cecília Ferreira da Silva¹,
Thelma Lúcia Novaes Adelino¹, Cintia Silva dos Santos¹, Gabriela Andrade Pereira¹,
Prescilla Emy Nagao², Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias³,
Ana Luiza Mattos-Guaraldi¹*, Raphael Hirata Júnior¹

¹Laboratório de Difteria e Corineiformes de Importância Médica, Faculdade de Medicina ²Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87/Fundos 3º andar, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

The production of fibrinous exudates may play an important role in determining the outcome of bacterial infection. Although pseudomembrane formation is a characteristic feature of diphtheria, little is known about the fibrinogen (Fbn)-binding properties of Corynebacterium diphtheriae strains and the influence of the gene that codes for diphtheria toxin (tox gene) in this process. In this study we demonstrated the ability of C. diphtheriae strains to bind to Fbn and to convert Fbn to fibrin. Bacterial interaction with rabbit plasma was evaluated by both slide and tube tests. Interaction of microorganisms with human Fbn was evaluated by both enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) Fbn binding assays. Nontoxicogenic and toxicogenic strains formed bacterial aggregates in the presence of plasma in the slide tests. The ability to convert Fbn to a loose web of fibrin in the plasma solution in the tube tests appeared to be a common characteristic of the species, including strains that do not carry the tox gene. Fbn binding to C. diphtheriae strains occurred at varying intensities, as demonstrated by the FITC-Fbn and ELISA binding assays. Our data suggest that the capacity to bind to Fbn and to convert Fbn to fibrin may play a role in pseudomembrane formation and act as virulence determinants of both nontoxicogenic and toxicogenic strains.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae* - diphtheria - fibrin - fibrinogen - pseudomembrane - nontoxicogenic

	MIM	mim 179	Dispatch: October 21, 2009	CE
	Journal	MSP No.	No. of pages: 10	PE: Helen

Microbiol Immunol 2009; 00: 1–10
doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00179.x

ORIGINAL ARTICLE

Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages

Cíntia Silva dos Santos^{1,3}, Louisy Sanches dos Santos³, Monica Cristina de Souza³, Fernanda dos Santos Dourado³, Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias², Priscila Soares Sabbadini³, Gabriela Andrade Pereira³, Maulori Curié Cabral¹, Raphael Hirata Junior³ and Ana Luíza de Mattos-Guaraldi³

¹Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (IMPPG/UFRJ), Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP: 21.941-590, ²National Institute for Quality Control in Health (INCQS/FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365 - Mangueiras, Rio de Janeiro, CEP: 21040-360 and ³Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (FCM/UERJ), Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, CEP: 20.551-030, Brazil

ABSTRACT

As interactions between bacteria and macrophages dictate the outcome of most infectious diseases, analyses of molecular mechanisms of non-opsonic phagocytosis should lead to new approaches for the prevention of diphtheria and systemic *Corynebacterium diphtheriae* infections. The present study aimed to evaluate human macrophage–bacteria interactions in the absence of opsonin antibodies and the influence of the *tox* gene on this process. Homologous *C. diphtheriae* *tox+* and *tox–* strains were evaluated for adhesion, entering and survival within U-937 human macrophages at different incubation periods. Higher numbers of viable bacteria associated with and internalized by macrophages were demonstrated for the *tox+* strain. However, viable intracellular bacteria were detected at T-24 hr only for the *tox–* strain. Cytoskeletal inhibitors, cytochalasin E, genistein and colchicine, inhibited intracellular viability of both strains at different levels. Bacterial replication was evidenced at T-24 hr in supernatants of monolayers infected with the *tox–* strain. Host cell death and nuclear alterations were evidenced by the Trypan blue exclusion assay and DAPI fluorescence microscopy. ELISA of histone-associated DNA fragments allowed detection of apoptosis and necrosis induced by *tox+* and *tox–* strains at T-1 hr and T-3 hr. In conclusion, human macrophages in the absence of opsonins may not be promptly effective at killing diphtheria bacilli. The presence of the *tox* gene influences the susceptibility of *C. diphtheriae* to human macrophages and the outcome of non-opsonic phagocytosis. *C. diphtheriae* strains exhibit strategies to survive within macrophages and to exert apoptosis and necrosis in human phagocytic cells, independent of the *tox* gene.

Key words apoptosis, *Corynebacterium diphtheriae*, cytoskeletal rearrangement, necrosis, non-opsonic phagocytosis, U-937 human macrophage cell line.

Correspondence

Professor Dr Ana Luíza de Mattos Guaraldi, Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brazil. CEP: 20.551-030. Tel: +55(021)2587-6380; fax: +55 (021)2587-6476; email: guaraldi@uerj.br

Received 13 March 2009; revised 27 July 2009; 27 August 2009; accepted 6 September 2009

G Model
JVAC-10851: No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Vaccine xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against *Neisseria meningitidis* B or diphtheria toxoid

Simone C. Cruz^a, Giselle P. Silva^a, Felipe J. Sampaio^a, Simone L. Souza^b, Alexandre Alves S.O. Dias^c, Lucimar G. Milagres^{a,*}

^aUniversidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 3^o andar, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bUniversidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Patologia e Laboratórios, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cInstituto Nacional de Controle de Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form 30 July 2010

Accepted 3 August 2010

Available online xxx

Keywords:

Memory B cell

Vaccine

Neisseria meningitidis

ABSTRACT

Since genome sequence data became available there has been a marked increase in number of protein antigens that have been suggested as prospective vaccine components against *Neisseria meningitidis* B (MenB). Few studies have addressed the mechanisms by which meningococcal vaccines generate and sustain immunological memory. The goal of this study was to compare the B-cell response (antibody-secreting cells [ASC], memory B cell and IgG) evoked by a MenB vaccine (VA-MENGO-BC[®]) with the B-cell response to diphtheria toxoid (DT) induced by a successful vaccine (Diphtheria–Tetanus–Pertussis [DTP]). The results showed different kinetics of specific ASC response after the primary and booster immunisations. Concerning the specific ASC kinetics, MenB vaccine induced a strong primary response, but the recall response showed a limited power over time. In contrast, DTP primary ASC response was weaker than the booster responses. We observed an increase in the relative percent of memory B cells after 1, 2 and 3 doses of MenB vaccine (mean of 0.8%, 1.3% and 1.6%, respectively) but without statistical significance. Similar frequencies were detected after boosting given at 4 months (mean of 1.3%) or 6 months (mean of 0.9%) following the third dose. DT specific memory B cell response showed a slight lower magnitude after the primary immunisation schedule (mean of 1.2% after the third dose) compared with the MenB response. However, a stronger memory B cell response was induced by booster doses of DTP vaccine at 4 months (mean of 1.9%) or 6 months (mean of 1.9%). The kinetics of specific IgG induced by both vaccines was similar, suggesting that memory B cells were responsible for the strong antibody response seen after the booster vaccination.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE D – Apresentações em Congressos e Posters



**VI
BIENAL
DE PESQUISA
XVI RAIC**

CERTIFICADO

AMAZÔNIA
EVOLUÇÃO E DIVERSIDADE
20 a 24 de outubro de 2008



FIOCRUZ 2008

Certifico que FELICIANO CORREA SILVA JUNIOR participou da sessão de pôster na VI Bienal de Pesquisa, realizada pelas Vice-Presidências de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico - VPPDT e de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho - VPDIGT, da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, no período de 20 a 24 de outubro de 2008, no Rio de Janeiro, apresentando o trabalho:

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TOXÓIDE DIFTÉRICO E DO SORO ANTIDIFTÉRICO NO DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE SÉPTICA EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS WEBSTER POR CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ATOXINOGÊNICO.

Com o(s) seguinte(s) co-autor(es): MARIA HELENA SIMÕES VILLAS BÔAS, ANA LUIZA DE MATTOS GUARALDI, RAPHAEL HIRATA JÚNIOR

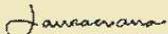
Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2008



José da Rocha Carvalho
Vice-Presidente de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico
Fundação Oswaldo Cruz



Paulo Gadelha
Vice-Presidente de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho
Fundação Oswaldo Cruz



Laura Cristina Simões Viana
Coordenadora de Recursos Humanos em Pesquisa/VPPDT
Fundação Oswaldo Cruz

Apio:



Realização:





XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "DIFTERIA POR CORYNEBACTERIUM ULCERANS: INFECÇÃO ZOONÓTICA NO BRASIL?" com a autoria de: DIAS, AASO, DOS SANTOS, C.S., SILVA JR, FCS, PEREIRA, GA, SOUZA, MC, CAMELLO, TCF, SABBADINI, PS, AZEVEDO, VA, VILAS-BÓAS, MHS, HIRATA JÚNIOR, R, MATTOS-GUARALDI, AL foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 10 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda
1º Secretário da SBM



***Corynebacterium ulcerans
infecting humans and dogs
in the metropolitan area of
Rio de Janeiro -Brazil***

AL Mattos-Guaraldi, MH Vilas Boas, AAS Oliveira Dias, FC Silva Jr, GA Pereira, M Sousa,
TCF Carnello¹, CBS Câmara, LGC Pacheco, A Miyoshi, VA Azevedo, R Hirata Jr

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
RJ; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de
Janeiro, RJ; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte, MG, Brazil.

guaraldi@pq.cnpq.br

