

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

Talita Bernardo Valadão

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Corynebacterium diphtheriae*  
TOXIGÊNICAS E ATOXIGÊNICAS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE  
*MULTILOCUS SEQUENCE TYPING***

Rio de Janeiro

2020

Talita Bernardo Valadão

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Corynebacterium diphtheriae*  
TOXIGÊNICAS E ATOXIGÊNICAS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE  
*MULTILOCUS SEQUENCE TYPING***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do 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 Ciências.

Orientadoras: Dra. Verônica Viana Vieira  
Dra. Ana Luíza de Mattos-Guaraldi

Rio de Janeiro

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Valadão, Talita Bernardo

Caracterização de linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* toxigênicas e atoxigênicas utilizando a metodologia de *Multilocus Sequence Typing*. / Talita Bernardo Valadão. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020. 71 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadores: Verônica Viana Vieira e Ana Luíza de Mattos Guaraldi.

1. *Corynebacterium diphtheriae*. 2. *Multilocus Sequence Typing*. 3. Toxina diftérica 4. Difteria 5. Sequência tipo. I. Título.

Characterization of toxigenic and atoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains using Multilocus Sequence Typing methodology.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Talita Bernardo Valadão

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Corynebacterium diphtheriae*  
TOXIGÊNICAS E ATOXIGÊNICAS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE  
*MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do 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 Ciências.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Robson de Souza Leão (Doutor)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

---

Andressa da Matta Durans (Doutor)  
Instituto Oswaldo Cruz

**ORIENTADORAS**

---

Verônica Viana Vieira (Doutor)  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Doutor)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para trilhar esse caminho e me permitido ver que eu seria capaz. À minha mãe, Mariza Abel Bernardo, por todo suporte, carinho e paciência nos dias mais estressantes, seu apoio foi fundamental.

Agradeço muito a minha orientadora Verônica Viana Vieira, sem ela eu não teria chegado até aqui. Obrigada por ter acreditado em mim, e mais do que isso, também ter me feito acreditar em mim. Obrigada por me dizer que tudo daria certo, todas as vezes que dava vontade de desistir, e obrigada por todo o ensinamento que levarei eternamente na minha vida profissional. Muito obrigada também a minha orientadora, Dra Ana Luiza Mattos Guaraldi. Obrigada pela ajuda e apoio durante este período.

Obrigada aos amigos e companheiros de laboratório: Cátia, Elisa, João e Maria Luiza, sou muito grata por toda ajuda, conselhos e companheirismo. Vocês foram incríveis e fundamentais.

Ao apoio, ensinamentos e amizade do Doutor Paulo Victor Baio, o qual estive disposto a me ajudar e ensinar a qualquer hora, sempre com muita paciência e simpatia. Muito obrigada por tudo, cada momento foi muito importante para mim.

Obrigada de coração à Juliana Nunes Ramos, nem sei o que seria se não fosse toda a sua colaboração, ensinamentos, apoio e amizade. Obrigada por ter estado sempre muito presente e ter sido tão solícita, até quando estava longe. Sem você também eu não teria conseguido.

Muito obrigada à amiga de laboratório Érica Miranda, que tanto me ajudou e não me deixou sozinha em nenhum momento. Agradeço imensamente por tudo o que fez, sua ajuda foi fundamental para eu chegar até aqui.

Agradeço às amigas Andressa, Daniela, Daniele, Gabrielle, Iuth, Luísa, Lohaine, Luana, Mariana, Morgana, Nathalia, Rachel, Sandrine. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e nesta etapa não foi diferente.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, à Capes, à Fiocruz, ao LIPMED.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram e permitiram que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

*Corynebacterium diphtheriae* é a espécie mais estudada do gênero *Corynebacterium*, e o patógeno causador de difteria, doença associada com infecções na pele ou no trato respiratório superior, com formação de uma pseudomembrana, a qual é a principal característica da doença. A difteria é uma doença imunoprevenível, a vacina baseada no toxoíde atua apenas contra a toxina do micro-organismo, e não tem eficácia contra as linhagens atoxigênicas, que vêm sendo cada vez mais relatadas causando outras formas de doença e têm recebido cada vez mais importância, pois estão associadas à infecções invasivas, como endocardite e osteomielite. O presente estudo teve como objetivo compreender melhor a epidemiologia da difteria no Brasil, utilizando Multilocus Sequence Typing (MLST) para caracterizar 47 linhagens de *C. diphtheriae* toxigênicas e atoxigênicas isoladas no Brasil entre 1980 e 2019. A tipificação por MLST identificou 28 sequências tipo (ST) diferentes, sendo 17 ST novos. A análise filogenética baseada no MLST confirmou a grande diversidade da espécie *C. diphtheriae* e mostrou que as linhagens desta espécie foram agrupadas em quatro clados. As linhagens toxigênicas e as atoxigênicas caracterizadas neste estudo se distribuíram em três dos quatro clados. Entretanto, é interessante observar que algumas linhagens toxigênicas apresentaram estreito relacionamento filogenético como exemplo as linhagens que causaram o surto no Maranhão em 2010 (ST176) e as isoladas no surto em Pernambuco em 2015 (ST643) e as linhagens isoladas de dois casos de difteria em Pernambuco em 2013 (ST212) e uma isolada em São Paulo em 2014 (ST651). Outra linhagem toxigênica atribuída ao ST176 foi isolada de um caso de difteria em Santa Catarina em 2012. Outras duas linhagens classificadas como ST174 foram isoladas no Rio de Janeiro em 1981 e no Acre em 2014, respectivamente. Estes dados mostraram linhagens toxigênicas disseminadas por estados distantes do país. Neste estudo foi possível avaliar também que a única linhagem de *C. diphtheriae* depositada no PubMLST isolada do surto da Venezuela em 2017 (ST697) está estreitamente relacionada as linhagens pertencentes ao ST174, isolada em 2014 no estado do Acre e alerta a probabilidade de surtos nos estados da região Norte do Brasil caso a cobertura vacinal seja negligenciada. Os resultados deste estudo podem ser usados para futuros estudos epidemiológicos mais aprofundados, e o conhecimento maior sobre o cenário geral da difteria no Brasil, pode auxiliar na orientação de ações de prevenção e controle desta doença imunoprevenível.

Palavras-chave: 1. *Corynebacterium diphtheriae*. 2. *Multilocus Sequence Typing*. 3. Toxina diftérica. 4. Difteria. 5. Sequência tipo.

## ABSTRACT

*Corynebacterium diphtheriae* is the most studied species of *Corynebacterium* genus, and pathogen that causes diphtheria, a disease associated with skin or upper respiratory tract infections, with pseudomembrane formation, which is the main characteristic of disease. Diphtheria is an immunopreventable disease, toxoid-based vaccine acts only against the toxin, and is not effective against atoxigenic strains, which have been increasingly reported causing other forms of disease and have received increasing importance, due they are associated with invasive infections, such as endocarditis and osteomyelitis. The present study aimed to better understanding of diphtheria epidemiology in Brazil using Multilocus Sequence Typing (MLST) to characterize 47 toxigenic and atoxigenic *C. diphtheriae* strains isolated at 1980 to 2019. MLST typification identified 28 different (ST) sequences, 17 of which are new. Phylogenetic analysis based on MLST confirmed the great diversity of *C. diphtheriae* species and showed that strains of this species were grouped into four clades. Toxigenic and atoxigenic strains characterized in this study were distributed in three of the four clades. However, it is interesting to note that some toxigenic strains showed a close phylogenetic relationship as an example, strains that caused the outbreak in Maranhão in 2010 (ST176) and those isolated in Pernambuco outbreak in 2015 (ST643), strains isolated from two cases of diphtheria in Pernambuco in 2013 (ST212) and an isolated one in São Paulo in 2014 (ST651). Another toxigenic strain attributed to ST176 was isolated from a case of diphtheria in Santa Catarina in 2012. Two other strains classified as ST 174 were isolated in Rio de Janeiro (1981) and in Acre (2014), respectively. These data showed toxigenic lines were disseminated to states far from the country. In this study it was also possible to evaluate that the only strain of *C. diphtheriae* deposited in PubMLST isolated from the outbreak of Venezuela in 2017 (ST697) is closely related to strains belonging to ST174, isolated in 2014 in state of Acre and alerts to probability of outbreaks in states in northern region of Brazil if there is a decrease in vaccination rate. The results of this study can be used for future more in-depth epidemiological studies, and greater knowledge about the scenario of diphtheria in Brazil and it can help guide prevention and control actions to this immunopreventable disease.

Keywords: 1. *Corynebacterium diphtheriae*. 2. Multilocus Sequence Typing. 3. Diphtheria toxin. 4. Diphtheria. 5. Sequence typing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Domínio da molécula da toxina diftérica, revelados por análise cristalográfica.....	17
Figura 2	Exemplo de um cromatograma gerado pelo sequenciamento de genes.....	36
Figura 3	Representação gráfica da distância entre ST das linhagens de <i>C. diphtheriae</i> , incluindo as do presente estudo utilizando a ferramenta GrapeTree.....	44
Figura 4	Análise filogenética gerada pela ferramenta iTOL, utilizando as linhagens de <i>C. diphtheriae</i> do PubMLST. O agrupamento destacado inclui a cepa tipo da espécie <i>C. belfantii</i> que foi depositada no referido banco de dados.....	45
Figura 4A	Análise filogenética não enraizada utilizando as linhagens de <i>C. diphtheriae</i> do PubMLST.....	46
Figura 4B	Imagem ampliada da figura 4 mostrando o clado referente a espécie <i>C. belfantii</i> . A linhagem brasileira 3683 (ST644), pertencente a espécie <i>C. belfantii</i> está destacada em vermelho.....	47
Figura 5	Análise filogenética das linhagens da espécie <i>C. diphtheriae</i> depositadas no banco PubMLST utilizando a ferramenta iTOL. As linhagens foram agrupadas em quatro clados. As linhagens deste estudo foram agrupadas nos clados 1 (cores tons de azul), 3 (cores tons de verde) e 4 (cores tons de vermelho e amarelo).....	48
Figura 5A	Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 1 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons azuis.....	51
Figura 5B	Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 3 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons verdes.....	52



Figura 5C Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 4 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons vermelhos e amarelos.....53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados das linhagens de <i>C. Diphtheriae</i> .....	31
Tabela 2 -	Genes, função dos genes, iniciadores da PCR e tamanho dos amplicons.....	34
Tabela 3 -	Sequências dos iniciadores para a reação de sequenciamento e tamanho dos fragmentos considerados para análise por MLST.....	34
Tabela 4 -	Linhagens bacterianas com os respectivos perfis de alelos e sequência tipo (ST).....	39
Tabela 5 -	Número de nucleotídeos diferentes entre alelos de sequências tipo relacionadas.....	433

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

16S rRNA	Subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossômico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBAS	Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde
DAT	<i>Diphtheria antitoxin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTP	Difteria-Tétano-Pertussis
dtxR	<i>Diphtheria toxin repressor</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF-2	<i>Elongation factor 2</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
NTTB	<i>Non-toxigenic toxin gene-bearing</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	Organização PanAmericana da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PNI	Programa Nacional de Imunização
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotação por minuto
Srta	Sortase
ST	<i>Sequence Type</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TD	Toxina diftérica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	<b>Gênero <i>Corynebacterium</i>.....</b>	<b>13</b>
1.2	<b><i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....</b>	<b>133</b>
1.3	<b>Difteria .....</b>	<b>14</b>
1.4	<b>Toxina diftérica .....</b>	<b>16</b>
1.5	<b>Linhagens não-toxigênicas carreadoras do gene <i>tox</i> .....</b>	<b>18</b>
1.6	<b>Linhagens atoxigênicas .....</b>	<b>188</b>
1.7	<b>Outros fatores de virulência .....</b>	<b>19</b>
1.8	<b>Aspectos epidemiológicos da difteria .....</b>	<b>21</b>
1.9	<b>Tratamento .....</b>	<b>244</b>
1.10	<b>Vacina .....</b>	<b>255</b>
1.11	<b>Tipagem molecular utilizando o <i>Multilocus Sequence Typing</i>.....</b>	<b>266</b>
1.12	<b>Relevância e justificativa .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>30</b>
2.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>311</b>
3.1	<b>Linhagens bacterianas e cultivo e identificação .....</b>	<b>311</b>
3.2	<b>Extração do ácido esoxirribonucleico (DNA) .....</b>	<b>333</b>
3.2.1	<b>Extração por lise térmica .....</b>	<b>333</b>
3.2.2	<b>Extração química.....</b>	<b>33</b>
3.3	<b><i>Multilocus Sequence Typing</i>.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	<b>Reação em cadeia da polimerase .....</b>	<b>344</b>
3.3.2	<b>Purificação dos produtos de PCR .....</b>	<b>35</b>
3.3.3	<b>Sequenciamento dos genes .....</b>	<b>35</b>
3.3.4	<b>Edição das sequências e submissão ao banco de dados PubMLST.....</b>	<b>36</b>

<b>3.4</b>	<b>Análise dos dados de <i>Multilocus Sequence Typing</i></b> .....	<b>37</b>
3.4.1	Análise da distância alélica dos ST pela ferramenta <i>GrapeTree</i> .....	37
3.4.2	Análise filogenética dos dados utilizando a ferramenta iTOL .....	37
<b>3.5</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>399</b>
<b>4.1</b>	<b>Linhagens bacterianas e identificação</b> .....	<b>399</b>
<b>4.2</b>	<b>Alelos e sequências tipo das linhagens de <i>C. diphtheriae</i></b> .....	<b>399</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise da tipagem molecular por MLST</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Toxigenicidade das linhagens e quadro clínico</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Relação alélica entre as sequências tipo utilizando a ferramenta <i>GrapeTree</i></b> .....	<b>42</b>
<b>2</b>		
<b>4.6</b>	<b>Análise filogenética utilizando a ferramenta iTOL</b> .....	<b>433</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>544</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>644</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe Actinobacteria e representa um grupo diverso de bactérias Gram-positivas. As corinebactérias podem ser encontradas na microbiota da pele e de mucosas em humanos e encontram-se amplamente disseminadas no meio ambiente. Os relatos de casos de infecções humanas causadas por algumas espécies do gênero *Corynebacterium* têm sido crescentes, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, podendo levar a óbito pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (RAMOS, 2014).

Infecções de origens variadas, sendo algumas fatais, têm surgido com maior frequência, em paralelo ao surgimento de linhagens multirresistentes a antimicrobianos, como o patógeno emergente *Corynebacterium striatum*, o que tem aumentado o interesse pelo estudo desse grupo de bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPI) (MCMULLEN et al., 2017, SOUZA et al., 2015). As manifestações clínicas das infecções dependem da espécie envolvida, sendo os principais sítios de infecção o trato urinário e respiratório inferior, sítios intravenosos (cateter e sangue), líquido, líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, abscessos e secreção ocular (BERNARD, 2012, RAMOS, 2014).

De acordo com a atualização mais recente da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, atualmente existem aproximadamente 174 espécies descritas no gênero *Corynebacterium* (PARTE, 2018). A espécie mais conhecida do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae* conhecido por causar difteria em seres humanos, ao ser lisogenizado por um fago específico, que é capaz de produzir e liberar uma exotoxina, chamada toxina diftérica. Já foi descrito, entretanto, que outras duas espécies do gênero: *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* também podem sofrer lisogenização por este determinado fago, e por isso podem também causar difteria. Estes dois gêneros são predominantemente isolados de animais (MOORE et al., 2015, SELIM et al., 2016).

## 1.2 *Corynebacterium diphtheriae*

*C. diphtheriae* é um micro-organismo patogênico, que tem como reservatório quase exclusivo o homem, sendo raros os relatos de casos de animais infectados

como porcos ou cavalos (DANGEL et al., 2019). Estas bactérias são Gram-positivas, em forma de bacilo, pleomórficas, não formadoras de esporos, imóveis, anaeróbias facultativas, e com alto conteúdo GC (~53%) em seu material genético. A espécie *C. diphtheriae* é classificada em três biotipos de acordo com as propriedades bioquímicas: mitis, gravis e intermedius (HASSAN et al., 2018). Linhagens de *C. diphtheriae* classificadas como pertencentes ao biotipo belfanti, foram recentemente classificadas como uma espécie nova, *Corynebacterium belfantii* de acordo com análises genômicas (DAZAS et al., 2018).

### 1.3 Difteria

Trata-se de uma doença que pode ser fatal, sendo por isso de notificação compulsória imediata (até 24 horas) em todo território nacional, de casos suspeitos e confirmados, conforme Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2018a). A doença é de evolução aguda e pode acometer pessoas não imunizadas ou parcialmente imunizadas, com manifestações locais e sistêmicas, que permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade nos diferentes continentes, inclusive em países com programas efetivos de imunização infantil (BITRAGUNTA et al., 2010, MAN et al., 2010, SAIKYA et al., 2010, SANTOS et al., 2015).

As formas clínicas mais comuns da difteria são faríngeas e cutâneas. Os principais sintomas de ambas as formas da doença são causados pela ação do principal e mais bem estudado fator de virulência de *C. diphtheriae*, a toxina diftérica (TD) (PEIXOTO et al., 2016).

Infecções cutâneas de difteria são mais comuns em regiões tropicais, geralmente sem apresentações clínicas sistêmicas, surgem em forma de lesões de pele infectadas e úlceras, ocorrendo frequentemente em combinação com más condições de higiene (ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014). Podem servir como reservatório e fonte para disseminação dos patógenos toxigênicos e causar difteria faríngea em indivíduos suscetíveis, o que representa um problema para a saúde pública (HASSAN et al., 2018, MEINEL et al., 2016).

A manifestação da difteria no trato respiratório superior, que acomete mais comumente a faringe, pela adesão da bactéria nas células faríngeas do hospedeiro, representa a forma clássica desta doença. O período de incubação é de 1-5 dias, e

tem início insidioso, com febre baixa e dor de garganta. Após 2-3 dias, em decorrência dos efeitos da liberação da TD e da resposta imune do hospedeiro, ocorre linfadenopatia juntamente com a formação de pseudomembranas acinzentadas, que ficam fortemente aderidas no sítio de infecção, compostas de células necróticas, fibrinas, células inflamatórias e bactérias. As pseudomembranas podem levar a obstrução das vias respiratórias, e conseqüentemente, a morte por asfixia (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020, HASSAN et al., 2018, SEKAR et al., 2017).

Complicações na doença também podem ocorrer após a TD se ligar a diversos tipos de células, podendo causar danos no miocárdio, no sistema nervoso periférico e nos rins (SKOGMAR; THAM, 2018).

Acreditava-se, até meados da década de 80, que a TD era produzida exclusivamente por linhagens de *C. diphtheriae* que carregavam o gene *tox*. No entanto, foram reportados casos de difteria em animais e humanos, causados por *C. ulcerans* toxigênico. Bacteriófagos portadores do gene *tox*, porém distintos dos que infectam *C. diphtheriae*, são capazes de lisogenizar *C. ulcerans*, que por sua vez passam a produzir TD. Entretanto, as sequências da TD em *C. ulcerans* apresentam alterações nos domínios de translocação e de ligação ao receptor quando comparadas com *C. diphtheriae* (SHARMA et al., 2019).

Outra espécie também conhecida pela produção de TD é *C. pseudotuberculosis*, que ao sofrer lisogenização por fago contendo o gene *tox*, é capaz de causar difteria em animais e raramente em humanos. Um estudo do genoma deste micro-organismo mostrou que a sequência do gene *tox* de *C. pseudotuberculosis* difere da sequência de *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* (VIANA et al., 2017). Nesses casos em que ocorre variação na sequência do gene *tox* e TD, a efetividade da vacinação é desconhecida (MOORE et al., 2015).

Na maioria dos países, a difteria é considerada uma doença do passado, dado que existe tratamento e vacina para evitá-la. Eficazes programas de vacinação em todo o mundo são capazes de manter uma alta cobertura vacinal, e conseqüentemente, conter novos casos da doença. Por outro lado, a consequência do declínio dos casos de difteria no mundo ao longo dos anos foi acompanhada por uma perda de conhecimentos concretos em relação ao seu tratamento, fazendo com que seja mais difícil para os profissionais de saúde identificar, isolar e tratar rapidamente os pacientes. A difteria acabou, então, tornando-se uma doença



negligenciada e esquecida, apesar de sua gravidade (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2017).

#### 1.4 Toxina diftérica

A TD é uma potente exotoxina que corresponde a um polipeptídeo de 353 aminoácidos, e apresenta uma dose letal mínima menor que 50-100 ng/kg de peso corporal. TD é composta de dois fragmentos: A e B, que estão unidos por pontes dissulfeto. Possui conformação em forma de Y, com três diferentes domínios: C (pertence ao fragmento A), T e R (pertencem ao fragmento B). Estes domínios por sua vez, estão relacionados respectivamente com as principais funções da toxina: catalisação, translocação e ligação ao receptor específico (FORBES, 2017, VIGUETTI, 2010).

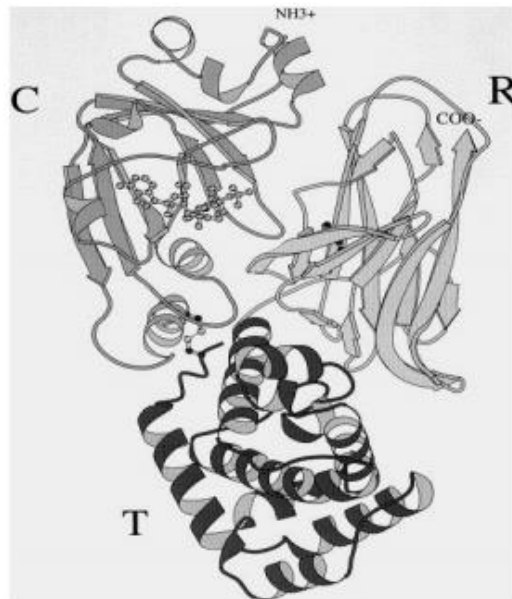
O mecanismo de ação da TD se dá pela ligação do receptor do fragmento B (domínio R) a um receptor de superfície celular do hospedeiro. Embora não tóxico, é o fragmento B que permite a entrada da TD na célula. A TD, então, transloca pelo caminho do endossomo, onde muda de conformação ao ser exposta a um pH ácido. O domínio T ajuda na clivagem e na liberação do domínio catalítico (fragmento A) para o citoplasma, o qual irá gerar um bloqueio na síntese protéica (**Figura 1**) (VIGUETTI, 2010).

O fragmento A atua na inibição da síntese protéica pela ribosilação da adenosina difosfato do fator de alongamento EF-2, levando a morte das células hospedeiras. Uma única molécula do fragmento A introduzida diretamente no citosol é suficiente para matar a célula eucariótica (FORBES, 2017, TROST et al., 2012).

Ao multiplicar-se na porta de entrada, o bacilo diftérico produz TD que se dissemina sistemicamente e atua em todos os tecidos, com especial tropismo para o miocárdio, sistema nervoso, rins e suprarenais (DIAS, 2011, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

As cepas toxigênicas de *C. diphtheriae* carregam o gene *tox* estrutural presente em corinebacteriófagos lisogênicos ( $\beta$ tox+,  $\gamma$ tox+,  $\omega$ tox+). Os corinebacteriófagos tox+ infectam *C. diphtheriae* e se integram ao cromossomo bacteriano, convertendo linhagens não-toxigênicas em toxigênicas (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011, ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014).

Figura 1 – Domínio da molécula da toxina diftérica, revelados por análise cristalográfica.



Fonte: (FERREIRA, 2013)

Embora o gene *tox* faça parte do genoma do fago, a regulação da expressão da TD é controlada pela bactéria. O gene *tox*, que é responsável pela codificação dos fragmentos A e B da toxina, é diretamente regulado pelo repressor *dtxR* (do inglês, *diphtheria toxin repressor*), presente no cromossomo de *C. diphtheriae*, e que faz parte de um grupo de proteínas reguladoras dependentes de metal. Em ambiente apresentando baixa concentração de ferro, o gene regulador *dtxR* é inativado, e a transcrição do gene *tox* é induzida (DANGEL, et al., 2019, DIAS, 2011, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011, SANGAL; HOSKISSON, 2016).

O ferro é um cofator essencial para importantes funções celulares, tais como biossíntese de DNA e respiração celular. Por este motivo, é uma estratégia comum do hospedeiro infectado limitar a disponibilidade de ferro a fim de suprimir o crescimento bacteriano. Desta forma, a bactéria precisa competir com o hospedeiro por ferro para estabelecer a infecção, um mecanismo que é relacionado com a produção de TD por *C. diphtheriae* toxigênico, já que a síntese de TD depende de concentrações baixas de ferro. Vale ressaltar que, segundo estudos, como o de Trost et al., já se sabe que existem alguns genes em *C. diphtheriae* que estão relacionados com a biossíntese de sideróforos, que atuam na captação de ferro

pelos micro-organismos, facilitando a absorção deste metal por *C. diphtheriae* e facilitando o sucesso da infecção (TROST et al., 2012).

### 1.5 Linhagens não-toxigênicas carreadoras do gene *tox*

Apesar do gene *tox* ser altamente conservado, por volta da década de 90, durante uma grande epidemia de difteria que aconteceu na Europa, diversos estudos passaram a relatar o surgimento de linhagens que sofreram mutação na sequência do gene *tox*. Estas linhagens perderam a função do gene, deixando de expressar a proteína, porém continuavam genotipicamente *tox+*, ou seja, possuíam o gene *tox*, mas não sintetizavam a TD. Estas linhagens passaram a ser chamadas de não-toxigênicas carreadoras do gene *tox* (do inglês *non-toxigenic tox gene-bearing* – NTTB) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017, ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014).

A verificação da presença do gene *tox* em linhagens de *C. diphtheriae* é feita rotineiramente em laboratórios, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), no entanto, para verificação da funcionalidade do gene é necessário realizar também o teste de Elek. Por conta disso, muitas linhagens reconhecidas como toxigênicas por possuírem o gene *tox*, na verdade podem não ter uma TD ativa (BILLARD-POMARES et al., 2017, DOYLE et al., 2017).

Um estudo realizado na Austrália em 2017, por Doyle et al., analisou a sequência do gene *tox* de 14 linhagens de *C. diphtheriae* *tox+*. Das 14 linhagens analisadas, duas apresentaram gene *tox* não funcionais devido a mutações por deleção de um único nucleotídeo no fragmento A da toxina, e códon de terminação prematuro, respectivamente, resultando no truncamento da sequência peptídica da toxina e perda da função da mesma (DOYLE et al., 2017).

As linhagens NTTB não são consideradas toxigênicas, mas são potenciais riscos para saúde pública por serem consideradas como reservatório do gene *tox*, isso porque podem passar a expressar um gene funcional por reversão da mutação que ocasionou a perda de função do gene, ou ainda por recombinação homóloga entre corinebacteriófagos, podendo se tornar toxigênicas (SANGAL; HOSKISSON, 2016).

### 1.6 Linhagens atoxigênicas

Linhagens de *C. diphtheriae* que perderam completamente o gene *tox*, são as chamadas atoxigênicas. Estas linhagens vêm emergindo cada vez mais, principalmente em países com altas coberturas vacinais, onde há maior pressão seletiva sobre as linhagens toxigênicas, resultando na prevalência da circulação de *C. diphtheriae* atoxigênica, como consequência da adaptação da bactéria à pressão seletiva vacinal. Isso mostra que a resposta imune induzida pela vacina pode influenciar na dinâmica evolucionária deste micro-organismo (FORBES, 2017, GROSSE-KOCK et al., 2017).

As linhagens atoxigênicas de *C. diphtheriae* também têm surgido como causa frequente de processos infecciosos que podem variar desde lesões cutâneas e faringites, a doenças invasivas severas. A vacina feita com toxóide diftérico atua apenas na TD produzida pela bactéria, não prevenindo doenças causadas por linhagens atoxigênicas, por isso indivíduos imunizados com o toxóide diftérico podem apresentar infecções invasivas como bacteremia, osteomielite e endocardite causadas por *C. diphtheriae* atoxigênica, na ausência de lesões mediadas pela toxina. Apesar da característica destrutiva das infecções invasivas, os aspectos de patogenicidade que favorecem a capacidade invasiva de certas linhagens de *C. diphtheriae* permanecem pouco claros (CLINTON et al., 2013, GOMES, 2012, ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014).

No entanto, o sucesso das infecções causadas por *C. diphtheriae* atoxigênicas, despertou o interesse de estudar outros fatores de virulência além da toxina. Apesar de ainda pouco conhecidos, já foram demonstrados fatores de virulência relacionados à adesão e à invasão celular, o que explica a ocorrência de doenças invasivas e persistentes. Infecções sistêmicas causadas por *C. diphtheriae* sugerem que esse patógeno é capaz de se ligar às células epiteliais do hospedeiro, obtendo acesso a tecidos mais profundos e persistindo nesses tecidos (OTT et al., 2010).

## 1.7 Outros fatores de virulência

Dentre os fatores de virulência associados à capacidade de adesão e de invasão, pode-se destacar a formação de pili na superfície da célula de *C. diphtheriae*; proteínas de superfície DIP0733, DIP1281 e a proteína 67-72 p que

além de estar associada nos processos de adesão e de invasão celular, também já teve comprovado seu papel na indução da morte celular por apoptose (BRODZIK et al., 2019, OTT et al., 2010, WEERASEKERA et al., 2018).

Estudos feitos por Weerasekera et al. (2018) indicaram que a proteína DIP0733 é crucial tanto na interação da bactéria com células epiteliais hospedeiras quanto na patogenicidade. Isso foi demonstrado pela investigação da função de uma região espiral C-terminal, presente em um homólogo da proteína DIP0733, que foi encontrada apenas em espécies patogênicas de corinebactérias. Para investigar a função desta região, foi realizado um ensaio com a expressão de uma forma truncada da região espiral C-terminal da DIP0733 em *C. diphtheriae*, e foi comparado com uma forma íntegra desta região, a fim de verificar se haveria mudança na virulência do micro-organismo. Como resultado foi percebida uma menor taxa de adesão e de invasão celular das linhagens que tiveram a região espiral C-terminal truncada, implicando na redução da virulência da bactéria. Este resultado ressalta a importância da proteína DIP0733 na virulência de *C. diphtheriae* (WEERASEKERA et al., 2018).

Já a proteína DIP1281 tem sua função associada com a organização da camada protéica de superfície externa de *C. diphtheriae*. A ausência desta proteína na superfície da bactéria parece causar alterações estruturais na superfície celular, que impedem a adesão e a invasão de *C. diphtheriae* na célula hospedeira (OTT et al., 2010).

Quanto ao papel da proteína 67-72 p encontrada na superfície da célula de *C. diphtheriae*, foi inicialmente conhecida apenas por sua função na invasão e na colonização de células hospedeiras. No entanto, estudos mais recentes comprovaram que esta proteína tem também capacidade de induzir morte celular, enviando sinal de apoptose nos estágios iniciais da infecção, função que era antes exclusivamente atribuída à ação da toxina diftérica (BRODZIK et al., 2019).

Por fim, existem ainda os pili, que são proteínas adesivas que se encontram ancoradas na parede celular bacteriana e desempenham papel importante na colonização e patogenicidade de *C. diphtheriae*. Cada pilus é composto de três proteínas: SpaA que é responsável pela formação do eixo do pilus, SpaB que forma a base, e SpaC que forma a ponta do pilus. A polimerização de cada pilus específico é dada pela ação de enzimas sortases específicas. Estudos realizados com linhagens que perderam Srta (sortase responsável pela produção de SpaA) tiveram

a capacidade de aderir às células faríngeas reduzidas em 90% (BRODZIK et al., 2019, CHANG et al., 2018).

Diversos estudos relatam a existência de grande diversidade em grupos (*clusters*) de genes de pili em *C. diphtheriae*, estes grupos de genes estão presentes em ilhas de patogenicidade adquiridas horizontalmente pelo micro-organismo. A diversidade de *clusters* de genes de pili entre diferentes linhagens pode estar associada com a variação de virulência entre linhagens de *C. diphtheriae* (CHANG et al., 2018, SANGAL et al., 2015, TROST et al., 2012).

### **1.8 Aspectos epidemiológicos da difteria**

Observa-se um aumento da incidência de difteria nos meses frios e secos (outono e inverno), quando é mais comum a ocorrência de infecções respiratórias, principalmente devido à aglomeração em ambientes fechados, que facilitam a transmissão do bacilo. Contudo, não se observa esse padrão sazonal nas regiões sem grandes oscilações de temperatura. A doença ocorre com maior frequência em áreas com precárias condições socioeconômicas, onde a aglomeração de pessoas é maior, e onde se registram baixas coberturas vacinais (BRASIL, 2014).

A transmissão do bacilo diftérico ocorre principalmente de pessoa a pessoa por gotículas de secreções respiratórias. Em regiões endêmicas, especialmente em áreas tropicais, as infecções de lesões de pele podem servir como reservatório para o bacilo diftérico em uma variedade de feridas de pele, como picadas de inseto, traumas, úlceras leishmanióticas e neoplásicas (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; AZEVEDO, 2013).

Uma das maiores epidemias de difteria e a maior registrada após o início da vacinação em massa, ocorreu na década de 1990 na Federação Russa, e espalhou-se rapidamente pelos Novos Estados Independentes. De 1990 a 1998 foram mais de 157.000 casos, que resultaram em aproximadamente 5.000 mortes. A população adulta foi a principal acometida, e a razão pela qual a epidemia aconteceu, foi devido à queda da cobertura vacinal, migração de militares e de civis, precárias condições de higiene e sanitárias, e a desorganização dos serviços de saúde associados à revolta política (DIAS, 2011, GROSSE-KOCK et al., 2017). Todos estes fatores citados associados a uma reduzida exposição natural ao patógeno nas décadas

anteriores resultaram em níveis de anticorpos abaixo dos níveis de proteção, o que tornou a população suscetível (SETH-SMITH; EGLI, 2019).

O principal clone toxigênico determinado pela metodologia de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), a sequência tipo 8 (ST8), foi o responsável pelo início da epidemia na Rússia e continuou circulando após o período de epidemia na Europa, conforme relatado em estudo que aponta a persistência do ST8 até os dias de hoje (DANGEL et al., 2018). Outro estudo feito por Czajka et al. relatou a presença do ST8 na Polônia entre 2004 e 2016, já após a grande epidemia da Rússia, causando infecções invasivas e infecções de pele. No entanto, foi observada a substituição do perfil de toxigenicidade das linhagens de ST8, que foram anteriormente isoladas como toxigênicas na Rússia, e anos depois foram isoladas como atoxigênicas na Polônia. A troca do perfil de toxigenicidade é atribuída à pressão seletiva exercida pelo aumento do número de indivíduos vacinados (CZAJKA et al., 2018).

De 2016 a 2017 na Alemanha, foi verificado um aumento da circulação de *C. diphtheriae* atoxigênicas, caracterizado em sua maior parte pelo ST8. Esta sequência tipo (ST) é a mais abundante encontrada no banco de dados que utiliza a metodologia de MLST para tipagem de *C. diphtheriae* (PUBMLST, 2020) e provavelmente na Europa (DANGEL et al., 2018). Atualmente, diversos surtos epidêmicos que continuam acontecendo no mundo, como na Índia, África do Sul, Venezuela e entre os refugiados sírios na Alemanha e na Suíça (BRASIL, 2018a, MEINEL et al., 2016, MAHOMED et al., 2017, SANGAL et al., 2017).

No Brasil, o número de casos notificados vem decrescendo progressivamente nas últimas décadas, devido a ampliação da cobertura vacinal, apesar da difteria permanecer endêmica nas diferentes regiões, sendo a principal e mais afetada a Região Nordeste. De 2008 a 2018, o Ministério da Saúde registrou 46 casos de difteria apenas no nordeste do Brasil, enquanto a região com menos registro, neste mesmo período, foi a Região Centro-oeste, com cinco casos. Destaca-se, entretanto, a ocorrência de um surto de difteria, em 2010, no estado do Maranhão com 28 casos da doença e um surto em Pernambuco em 2015 com 11 casos (BRASIL, 2019b, SANTOS et al., 2015).

O Ministério da Saúde registrou um total de 89 casos de difteria no Brasil, nos últimos dez anos. Não se pode, no entanto, descartar a possibilidade de subnotificação de casos no Brasil e em outros países em desenvolvimento devido à falta de esclarecimento da população para a busca de atendimento médico e às

dificuldades de obtenção do diagnóstico clínico-laboratorial em casos de difteria, em particular quando os pacientes estão parcialmente protegidos contra a ação da TD (BRASIL, 2019b, DIAS et al., 2011, SANTOS et al., 2015).

Atualmente no mundo ainda há países com surtos ativos de difteria. Nas Américas, três países vêm notificando casos da doença: Colômbia, Haiti e Venezuela. A Colômbia confirmou oito casos, incluindo três óbitos, entre janeiro e dezembro de 2018. No Haiti, o surto que se iniciou no ano de 2014, vêm se estendendo até a atualidade. Do ano de 2014 até 2018, 264 casos foram confirmados, com 106 mortes. Os casos reportados em 2018 no Haiti foram maiores do que em 2016 e 2017, e segundo a atualização epidemiológica disponibilizada pelo *site* da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o aumento do número de casos reportados está associado ao desenvolvimento da sensibilidade dos sistemas de vigilância nacional. A faixa etária mais atingida nestes países compreende crianças com 6 a 14 anos de idade (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Na Venezuela, um surto de difteria que se iniciou em julho de 2016, continua ativo, e desde então, o número de casos confirmados e óbitos é crescente. Até o início de 2019, foram reportadas 270 mortes por difteria na Venezuela, sendo a maior taxa de incidência reportada nos menores de 15 anos de idade (BRASIL, 2019a, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019a). O surto de difteria ativo na Venezuela é motivo de preocupação para os sistemas de saúde e vigilância do Brasil, tendo em vista que a Venezuela faz fronteira com o Brasil, e muitos venezuelanos imigram para o Brasil em virtude da crise política e econômica daquele país. Em 2018, existiam aproximadamente 180 mil refugiados e migrantes venezuelanos no Brasil, com uma média de 500 novas pessoas chegando por dia (ALTO COMISSARIADO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA OS REFUGIADOS, 2019). Uma especialista em imunização da OPAS ressaltou que a situação do Haiti e da Venezuela acende um alerta para os países que fazem fronteira com eles, como Brasil, República Dominicana e Colômbia (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019b).

Um dos aspectos epidemiológicos mais relevantes da atualidade, em relação a doenças transmissíveis, especialmente as negligenciadas, como a difteria, são os viajantes, que devido a globalização têm cada vez mais facilidade de mobilidade entre um país e outro em poucas horas, e os refugiados provenientes de locais com



baixas condições socioeconômicas, sanitárias e baixas taxas de coberturas vacinais, que migram para os mais diversos países, em busca de melhores condições de vida (MAY; MCDOUGALL; ROBSON, 2013, MEINEL et al., 2016).

Viajantes e refugiados que migram de áreas endêmicas para difteria como África, Índia e América do Sul, para países onde a incidência da doença é baixa, devido a altas coberturas vacinais, acabam levando este patógeno para regiões onde antes não havia circulação dele. Apesar das altas coberturas vacinais, populações que não tem contato com determinado micro-organismo se tornam mais suscetíveis quando os níveis de anticorpos vacinais começam a decair (FORBES, 2017, ZASADA, 2015).

Um fator agravante no caso dos refugiados é que frequentemente estes indivíduos possuem um vago histórico médico e falta de conhecimento sobre o status vacinal, sem contar que barreiras culturais, de idiomas e experiências traumáticas vividas por estes grupos, levam a perda de detalhes importantes sobre a rota de viagem e outros aspectos relevantes para o manejo médico (MEINEL et al., 2016).

A preocupação dos órgãos de saúde pública com a possibilidade de novas epidemias de difteria ainda é constante, devido à permanência do agente etiológico circulando na população (GAYRETLI et al., 2017). A vacinação em massa que ocorreu em alguns países modificou as manifestações clínicas da doença. A ocorrência de infecções localizadas ou sistêmicas em humanos, incluindo pneumonia, bacteremia, osteomielite, entre outros, por cepas atoxigênicas enfatiza a expressão de outros mecanismos de virulência além da produção da toxina diftérica (TORRES et al., 2013, SANTOS et al., 2015, PEIXOTO et al., 2016).

## **1.9 Tratamento**

O tratamento para pacientes com suspeita de difteria envolve isolamento dos mesmos e administração do soro antidiftérico derivado de equino (anticorpo policlonal IgG), que tem por finalidade inativar a TD circulante o mais rápido possível. No entanto, este não tem efeito sobre a toxina já impregnada no tecido, ou seja, após a toxina entrar na célula, o soro não tem mais efeito sobre ela. É fundamental que o soro antidiftérico seja administrado intravenosamente ou

intramuscularmente, o mais rápido possível após o início da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Vale ressaltar que o acesso global ao soro se encontrava limitado, pois a maioria dos fabricantes não estava produzindo o soro. A indisponibilidade do produto e episódios de atraso também estavam sendo relatados na Europa e em outros lugares (SMITH et al., 2016, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

No Brasil, o soro antidiftérico que é produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo) se encontrava disponível apenas em baixa potência para utilização, sem previsão para normalização na distribuição do produto. Devido à indisponibilidade do soro tanto no mercado nacional quanto no internacional e aos riscos atrelados ao uso de soro de baixa potência, foi solicitado à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), autorização para utilização de soro antidiftérico com potência abaixo da especificação do produto, que é de 1.000 UI/mL. O uso foi autorizado e estava sendo utilizado desde 2013 (BRASIL, 2018b). No entanto, no início de 2020, o Ministério da Saúde emitiu um ofício informando sobre a normalização da distribuição do soro diftérico na potência de 1.000 UI/mL, revogando a Nota Informativa anterior (NI no. 162/2019 – CGPNI/DEVIT/SVS/MS) que orientava a administração de soro numa potência menor (BRASIL, 2020).

Como o soro antidiftérico (SAD) não possui efeito sobre a bactéria, para a eliminação do patógeno, é administrado antibiótico, que pode ser eritromicina ou penicilina (BRASIL, 2014). Após 48 horas do início do uso do antibiótico, o indivíduo não é mais capaz de transmitir a doença, no entanto, é de suma importância que o tratamento seja feito até o final para garantir que a bactéria tenha sido eliminada por completo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Em casos mais graves, onde a pseudomembrana está causando obstrução respiratória, é necessário que se faça intervenções como traqueostomia, remoção mecânica das pseudomembranas, intubação ou possivelmente oxigenação por membrana extracorpórea para evitar a morte por asfixia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

## **1.10 Vacina**

A introdução da vacina com toxóide diftérico aconteceu em 1923, e a difusão da vacinação em massa, entre 1940 e 1950, levou a quase total eliminação da

doença nos países industrializados. No entanto, a difteria continuou endêmica em muitos países em desenvolvimento (DU PLESSIS et al., 2017).

A proteção contra *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. A imunidade adquirida é obtida através da vacinação com o toxóide diftérico (Ex. vacina tríplice bacteriana – DTP contra difteria, tétano e coqueluche) e não com antígenos somáticos. A vacinação com o toxóide diftérico confere proteção apenas contra a TD e não contra a colonização ou infecção pelo micro-organismo (BRASIL, 2014, BRASIL, 2015, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR., DAMASCO, 2011;).

Segundo o Ministério da Saúde, o esquema de vacinação deve ser iniciado no primeiro ano de vida, sendo a primeira dose aos 2 meses de idade, a segunda dose aos 4 meses e a terceira dose aos 6 meses. Depois, doses de reforço devem ser administradas aos 15 meses e aos 4 anos de vida. Por fim, são feitos reforços a cada dez anos da data da última dose administrada (BRASIL, 2014, BRASIL, 2015).

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. Um eficaz programa de vacinação é capaz de conter o avanço de epidemias, porém não erradica o estado de portador assintomático na população. Assim, temos tanto a circulação de cepas atoxinogênicas quanto toxinogênicas (GAYRETLI et al., 2017).

Desde 2010, a cobertura vacinal com a DTP no mundo, permaneceu em torno de 86%, sendo que a necessária para proteger contra surtos e doenças evitáveis por imunização é 95% (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019c). Atualmente, as guerras e as grandes instabilidades socioeconômicas que vêm acontecendo no mundo, acabam afetando os sistemas de saúde, tornando o acesso à vacina limitado ou inexistente, o que acarreta uma brusca queda da cobertura vacinal e conseqüente aumento dos casos da doença. Este fato demonstra um grande problema de saúde pública, já que por se tratar de uma doença negligenciada, não há medidas de controle e tratamento rápidas e eficazes (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2018).

### **1.11 Tipagem molecular utilizando o *Multilocus Sequence Typing***

A utilização de técnicas de tipificação molecular, quando foram desenvolvidas, mostraram diversidade intraespécie significativa, como exemplo, o MLST que foi proposto em 1998. As técnicas de tipificação molecular passaram então a substituir as anteriores que eram com bases bioquímicas e morfológicas, as quais forneciam uma resolução limitada (BOLT et al., 2010).

Para tipagem molecular de linhagens de *C. diphtheriae* circulantes e envolvidas em surtos epidêmicos, utiliza-se a metodologia MLST, com o intuito de agrupar as linhagens relacionadas em complexos clonais (CC) por meio do sequenciamento e análise de fragmentos de sete genes constitutivos (*housekeeping*). Os genes constitutivos estão localizados no cromossomo e codificam funções essenciais para o metabolismo microbiano. Cada um dos sete genes é amplificado, sequenciado, analisado, e de acordo com as mutações encontradas na sequência, determina-se o número de genes alelos para aquele *locus*. Para cada gene, as sequências são referidas como alelos e o conjunto de diferentes alelos define a ST de cada linhagem bacteriana. Grupos com o mesmo perfil de alelos representam clones. As sequências que diferem em apenas um nucleotídeo são consideradas como alelos diferentes (BOLT et al., 2010).

Segundo Das Vertentes (2012), MLST é amplamente utilizado para tipagem molecular em estudos epidemiológicos, graças ao aumento na disponibilidade e redução do custo do sequenciamento, e também devido ao desenvolvimento da tecnologia de informação (DAS VERTENTES, 2012). Esse método é uma das ferramentas de genotipagem usadas para epidemiologia molecular, já que se baseia em comparações detalhadas de um patógeno usando informações genéticas. As relações genéticas podem ser visualizadas em árvores filogenéticas, onde os isolados podem ser agrupados e possíveis ligações moleculares epidemiológicas podem ser fornecidas (SETH-SMITH; EGLI, 2019). Por se basear em sequências nucleotídicas, o MLST é considerado um método rápido, de alta acurácia, boa reprodutibilidade e grande capacidade discriminatória, podendo até mesmo distinguir linhagens estreitamente relacionadas (DAS VERTENTES, 2012).

As linhagens podem ser discriminadas com base em uma única alteração nucleotídica em apenas um dos sete genes analisados. A tipagem feita pela análise nucleotídica traz uma vantagem ao MLST em relação a outras técnicas de tipagem como o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e a ribotipagem que é a elevada

capacidade discriminatória. A ribotipagem era até então considerada padrão ouro entre as técnicas de tipagem (BOLT et al., 2010).

O PFGE é uma técnica baseada na análise de padrões de bandas de eletroforese, podendo haver uma análise incorreta dos resultados, além de não permitir a realização de inferências filogenéticas entre as linhagens, e não revelar claramente a estrutura populacional ou mecanismos evolutivos dentro de uma espécie (VIGUETTI, 2010). Já a ribotipagem consiste na amplificação de sequências de regiões espaçadoras entre os genes do rRNA 16S e 23S (SCHUMANN, PUKALL, 2013). No entanto, a ribotipagem necessita de métodos altamente padronizados para que não haja dificuldades na sua reprodutibilidade (BOLT et al., 2010).

Para validar a acurácia e o poder discriminatório do MLST, Bolt et al. compararam dados de linhagens tipadas por ribotipagem com o esquema proposto de MLST, e de modo geral, houve concordância entre ambos. No entanto, o MLST obteve uma melhor resolução em dois casos: identificou a variação de um locus dentro de um ribotipo, e fez a distinção dentro de dois isolados de um ribotipo (BOLT et al., 2010).

Atualmente, são aproximadamente 716 ST depositados no banco de dados PubMLST (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) considerando as espécies *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. O esquema de MLST para o bacilo diftérico foi proposto em 2010 por Bolt et al., utilizando as sequências de sete genes constitutivos, com um total de 150 linhagens de *C. diphtheriae* de 18 países diferentes, no período de 1957 a 2006, sendo a maioria das linhagens (= 96) toxigênicas (JOLLEY; MAIDEN, 2010, LOWE et al., 2011). No Brasil, um estudo epidemiológico utilizando MLST foi realizado com seis estirpes atoxigênicas (quatro casos de endocardite e dois casos de pneumonia) do Rio de Janeiro, entre os anos de 1993 e 2000, que foram classificadas em seis ST distintos, sendo que uma das linhagens pertenceu ao ST 128, um clone anteriormente visto na Romênia em 1964, na França, nos anos de 1987 e 2003, e na Argélia em 2003 (VIGUETTI et al., 2012).

### **1.12 Relevância e justificativa**

No Brasil há uma carência de informações sobre a epidemiologia de estirpes brasileiras, principalmente as toxigênicas de *C. diphtheriae*, patógeno reemergente de notificação compulsória que tem sido isolado de diferentes síndromes infecciosas.

Em decorrência do programa de imunização no país, casos de difteria vêm decrescendo nas últimas duas décadas. Entretanto, casos e surtos epidêmicos esporádicos ainda ocorrem no Brasil, destacando-se o surto de difteria no Maranhão em 2010, onde a maioria dos 28 casos confirmados acometeram crianças imunizadas ou parcialmente imunizadas, resultando em três óbitos, e o surto em Pernambuco em 2015 com 11 casos e um óbito (SANTOS et al., 2015, BRASIL, 2017), além de casos de infecções invasivas causadas por estirpes não toxigênicas (ENCINAS et al., 2015).

Estes dados, aliados à falta de informação sobre linhagens brasileiras, enfatizam a necessidade e importância de se estudar este micro-organismo que é atualmente negligenciado.

Apesar de surtos epidêmicos ainda acontecerem no Brasil, existe falta de informação e conhecimento sobre a doença, por parte dos profissionais de saúde no que diz respeito a identificação e diagnóstico do patógeno (MATTOS-GUARALDI et al., 2011).

O estudo epidemiológico e o aprimoramento dos sistemas de vigilância das doenças são de extrema importância para se conhecer, intervir e recomendar ações que visem seu controle; para tanto é necessário conhecer os diferentes componentes da cadeia de transmissão, assim como os seus fatores de risco (BRASIL, 2010).

A OMS estabelece como umas das três medidas no controle da difteria a prevenção de mortes e complicações pelo diagnóstico precoce e manejo apropriado dos casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Assim, a realização de estudos epidemiológicos moleculares é importante para a caracterização de estirpes circulantes no Brasil, principalmente no que se refere às toxigênicas, já que os efeitos gerados pela toxina são muito graves, podendo causar danos no músculo cardíaco, no tecido nervoso e ainda levar a óbito pelo bloqueio da passagem de ar, devido a formação de uma pseudomembrana no trato respiratório superior.

Vale ressaltar que a Vigilância Sanitária surgiu com o intuito de evitar a propagação de doenças, e suas ações envolvem a promoção, proteção e recuperação da saúde, assim como a fiscalização de portos, aeroportos e fronteiras. Portanto os dados obtidos neste estudo poderão auxiliar na tomada de medidas de prevenção e propagação da difteria pelo Brasil e pelo mundo, o que abrange as ações de Vigilância Sanitária.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Utilizar a metodologia de MLST para realizar uma análise epidemiológica molecular de linhagens de *C. diphtheriae*, toxigênicas e atoxigênicas, para orientar ações de prevenção e controle da Vigilância Sanitária.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Atribuir ST para as linhagens de *C. diphtheriae* isoladas no Brasil;
- Determinar a diversidade genética de *C. diphtheriae* e avaliar as possíveis relações clonais entre as linhagens brasileiras (envolvidas em surtos ou não) e as linhagens do mundo, a fim de caracterizar as linhagens circulantes em surtos epidêmicos;
- Correlacionar os clones de *C. diphtheriae* com as características clínicas das diferentes estirpes.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Linhagens bacterianas e cultivo e identificação

Neste estudo foram utilizadas 47 linhagens bacterianas pertencentes ao Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que atua como Centro Colaborador de Diagnóstico para Difteria do Ministério da Saúde. A identificação no LDCIC foi realizada por métodos fenotípicos utilizando o sistema API Coryne (BioMerieux), e por métodos genotípicos utilizando a PCR multiplex para identificação de bactérias corineformes toxigênicas. A confirmação da identificação da espécie foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), utilizando a análise da sequência do gene *rpoB*. As sequências das linhagens foram comparadas com a sequência do gene *rpoB* da linhagem tipo depositada no GenBank, empregando a ferramenta BLAST–NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os isolados foram cultivados em ágar sangue (ágar BHI acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro) a 37° C por 48 h. Todas as linhagens foram preservadas e depositadas na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) da Fiocruz. Os dados referentes as linhagens bacterianas estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados das linhagens de *C. Diphtheriae* (continua).

Número LDCIC <sup>a</sup>	Localidade	Doença/ Sítio de isolamento	Tox <sup>b</sup>	Sexo	Idade	Ano <sup>c</sup>
9	Rio de Janeiro	Difteria/ Orofaringe	Neg <sup>d</sup>	F <sup>e</sup>	16	2011
90	Rio de Janeiro	Lesão cutânea/ Secreção	Pos <sup>f</sup>	NI <sup>g</sup>	NI	1980
371	Rio de Janeiro	Infecção cirúrgica na face/ Secreção	Neg	M <sup>h</sup>	45	1998
477	Rio de Janeiro	Infecção cirúrgica de nasofaringe/ Faringe	Neg	F	14	1998
812	Rio de Janeiro	Carcinoma de Laringe/ Pneumonia/ Pulmão	Neg	M	71	2000
813	Rio de Janeiro	Carcinoma de Laringe/ Pneumonia /Faringe	Neg	M	71	2000
814	Rio de Janeiro	Carcinoma de Laringe/ Pneumonia/ /Laringe	Neg	M	71	2000
1104	Rio de Janeiro	Angiofibroma de nasofaringe/ Faringe	Neg	M	16	2002
1139	Rio de Janeiro	Úlcera venosa crônica na perna/ Secreção	Neg	M	77	2002
1176	Rio de Janeiro	Burkitt's linfoma/Cérebro/ LCR	Neg	M	14	2002
1178	Rio de Janeiro	Burkitt's linfoma/Cérebro/ LCR	Neg	M	14	2002
1219	Rio de Janeiro	Carcinoma de septo nasal/ Radionecrose no maxilar /Secreção	Neg	M	74	2003
1233	Rio de Janeiro	Úlcera crônica / Nasofaringe	Neg	F	32	2003



Tabela 1 – Dados das linhagens de *C. Diphtheriae* (continuação).

Número LDCIC <sup>a</sup>	Localidade	Doença/ Sítio de isolamento	Tox <sup>b</sup>	Sexo	Idade	Ano <sup>c</sup>
1491	Rio de Janeiro	Carcinoma na parótida/ Otite e Mastoidite/ Secreção do ouvido	Neg	M	4	2004
1624	Rio de Janeiro	Carcinoma da Laringe/ Pneumonia/ Pulmão	Neg	M	56	2005
1641	Rio de Janeiro	Inflamação do tumor de nasofaringe/ Nasofaringe	Neg	M	73	2005
1911	Rio de Janeiro	Cisto de Nasofaringe/ Rinite purulenta/ Nasofaringe	Neg	M	8	2008
2494	Pernambuco	Difteria/ Nasofaringe	Pos	F	5	2013
2495	Pernambuco	Difteria/ Nasofaringe	Pos	F	NI	2013
2496	Pernambuco	Difteria/ Nasofaringe	Pos	M	8	2013
2497	Pernambuco	Difteria/ Nasofaringe	Pos	F	1	2013
2520	Rio de Janeiro	Úlcera cutânea/ secreção	Neg	M	NI	2013
2587	São Paulo	Difteria/ Orofaringe	Pos	M	45	2014
2626	Pernambuco	Endocardite/ Sangue	Neg	M	23	2015
2628	Pernambuco	NI/ Secreção	Neg	F	18	2015
2634	Rio de Janeiro	Endocardite/ Sangue	Neg	M	21	2015
2635	Rio de Janeiro	Difteria/ Nasofaringe	Neg	M	21	2015
2636	Rio de Janeiro	Difteria/ Orofaringe	Neg	M	21	2015
2666	Rio de Janeiro	Endocardite/ Sangue	Neg	NI	NI	2015
2667	Rio de Janeiro	Endocardite/ Sangue	Neg	F	19	2015
2685	Pernambuco	Difteria/ Nasofaringe	Pos	M	7	2015
2717	Pernambuco	Difteria/ Orofaringe	Neg	F	25	2016
2893	Rio de Janeiro	Endocardite/ Sangue	Neg	F	NI	2018
2962	Minas Gerais	Lesão cutânea na perna/ Secreção	Neg	F	76	2019
3681	Santa Catarina	Difteria/ Nasofaringe	Pos	M	21	2012
3683	São Paulo	Difteria/ Escarro	Pos	F	86	2014
3684	Acre	Difteria/ Orofaringe	Pos	F	6	2014
5003	Rio de Janeiro	Carcinoma de Bexiga/ Nefrostomia/ Sítio de inserção do cateter	Neg	M	73	2008
5015	Rio de Janeiro	Carcinoma do septo nasal/ Osteomielite no osso frontal/ Osso	Neg	F	41	2009
HC06	Rio de Janeiro	Endocardite/ sangue	Neg	M	27	2010
L10S24	Bahia	Úlcera leishmaniótica/ Secreção	Neg	NI	NI	1980
MA 19	Maranhão	Difteria/Nasofaringe	Pos	F	3	2010
MA 23	Maranhão	Difteria/ Nasofaringe	Pos	F	5	2010
MA 52	Maranhão	Difteria/ Nasofaringe	Pos	M	6	2010
MA 131	Maranhão	Difteria/ Nasofaringe	Pos	F	9	2010
MA 136	Maranhão	Difteria/ Nasofaringe	Neg	F	11	2010
MA 150	Maranhão	Difteria/Nasofaringe	Pos	F	6	2010

Legenda: <sup>a</sup>LDCIC – Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica; <sup>b</sup>Tox – toxigenicidade verificada pela detecção do gene tox; <sup>c</sup>ano de isolamento; <sup>d</sup>Neg – negativa; <sup>e</sup>F – feminino; <sup>f</sup>Pos – positiva; <sup>g</sup>NI – não informado; <sup>h</sup>M – masculino.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

## 3.2 Extração do ácido desoxirribonucleico

### 3.2.1 Extração por lise térmica

Após incubação das linhagens por 48 horas a 37°C em ágar sangue, uma pequena quantidade de massa bacteriana foi transferida para microtubo com 1 mL de solução salina 0,85 %, que foi centrifugado a 24.000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e a cultura bacteriana foi ressuspensa em 500 µL de água ultra pura estéril livre de Dnase e Rnase e submetido a banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos. Após esta etapa, a suspensão bacteriana foi imediatamente congelada a – 20°C (BAIO et al., 2013).

### 3.2.2 Extração química

Algumas linhagens tiveram o DNA extraído pelo kit comercial Sigma-Aldrich GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep. Resumindo, com auxílio de uma alça estéril, foi removida uma parte do crescimento bacteriano cultivado em ágar sangue, que foi transferida para um microtubo com 1 mL de solução salina 0,85 %, que foi centrifugada a 24.000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e a cultura bacteriana foi utilizada no ensaio de extração química. Após esta etapa, se iniciou a extração de DNA segundo recomendações do fabricante.

## 3.3 *Multilocus Sequence Typing*

As amostras foram submetidas à amplificação e purificação dos *amplicons* e ao sequenciamento e análise dos sete *loci* que compõem o esquema de MLST para *C. diphtheriae* conforme proposto por Bolt et al. (2010) e descrito no *site*: <https://pubmlst.org/cdiphtheriae/>. O sequenciamento de DNA foi realizado na plataforma de sequenciamento de Sanger do IOC. As sequências dos iniciadores utilizados nas reações da PCR e nas reações de sequenciamento estão descritas nas **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 2 – Genes, função dos genes, iniciadores da PCR e tamanho dos amplicons.

Genes	Função do gene	Iniciadores		Tamanho amplicon
		Forward	Reverse	
<i>atpA</i>	Cadeia alfa da ATP sintase	GCGATTGCGAACTACACC	CTCGAGGAATACCTRACC	1029 pb
<i>dnaE</i>	Subunidade alfa da DNA polimerase III	TGCGTCATCTGATTGAAA	CGGTCCAATAAGACACCA	858 pb
<i>dnaK</i>	Chaperona DNA K	ACTTGGGTGGCGGTACTT	TGGTGAACGTCTCGGAAC	696 pb
<i>fusA</i>	Fator de alongamento EF-G	TACCGCGAGAAGCTCGTT	GAAGGTTGGGTCCTCTTC	683 pb
<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintase	CGTGCACTTCTACAACCTC	ACCGTGATCGGTCTTCAT	865 pb
<i>odhA</i>	Componentes E1 e E2 da 2-oxoglutarato dehydrogenase	CGGCAAGGAAASCATGAC	GTTGTGCGCCRAACATCTG	505 pb
<i>rpoB</i>	Subunidade $\beta$ da RNA polimerase	AAGCGCAAGATCCAGGAC	TCGAACTCGTCGTCATCC	845 pb

Legenda: pb, pares de base; R, guanina ou adenina.

Fonte: (<https://pubmlst.org/>)

Tabela 3 – Sequências dos iniciadores para a reação de sequenciamento e tamanho dos fragmentos considerados para análise por MLST.

Gene	Iniciadores		Tamanho do fragmento
	Forward	Reverse	
<i>atpA</i>	AGAAGGCGACGAAGTMAAG	CRGAATCAGAAGCTGGWGCA	378 pb
<i>dnaE</i>	GTGCGACAAGCTGGTGTG	GGCTTWCGGCCATTYTTG	354 pb
<i>dnaK</i>	AGATGGCTATGCAGCGTCT	GATGAGCTTGGTCATCACG	345 pb
<i>fusA</i>	CGTAAGCTGACCGTTAACTC	CCATGGACTCRAGGATGA	360 pb
<i>leuA</i>	CCYATCATCATCAAYCTGCC	CAGCTGGTTGCAGTAYTC	384 pb
<i>odhA</i>	TBCAAGATCGCATYGARRC	TWGGCTCGATGTGKCCTTC	381 pb
<i>rpoB</i>	CGWATGAACATYGGBCAGGT	TCCATYTCRCCRAARCGCTG	342 pb

Legenda: pb, pares de base; R, guanina ou adenina; Y, timina ou citosina; K, guanina ou timina; W, adenina ou timina.

Fonte: (<https://pubmlst.org/>)

### 3.3.1 Reação em cadeia da polimerase

As reações de PCR para as linhagens de *C. diphtheriae* foram realizadas conforme descrito no *site*: <https://pubmlst.org/cdiphtheriae/>. Foram amplificados sete genes constitutivos (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB*), de acordo com o esquema de MLST para *C. diphtheriae*. A PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L. Cada reação foi composta de água ultra pura estéril livre de Dnase e Rnase, tampão de reação 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (dNTP – [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10 mM), 100 ng de cada iniciador, 1,5 U da enzima Taq polimerase (Promega) e 3  $\mu$ L do DNA. As condições para a amplificação dos genes foram: pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos. Para verificar a amplificação dos fragmentos dos genes foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE (Tampão tris-acetato-EDTA) 1X. Para tal, 5  $\mu$ L de cada produto da PCR foram aplicados nos orifícios do gel acrescidos de 2  $\mu$ L de *loading buffer*. Em um dos orifícios do gel foi aplicado o padrão de DNA contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (100 pb DNA ladder, Invitrogen). Após eletroforese realizada em tampão TAE 1X, sob uma corrente de 60 V por 1 hora, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizados no fotodocumentador (BioRad).

### 3.3.2 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o *kit* PCR DNA & Gel Banda Purification (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Para verificar a concentração dos amplicons foram realizadas eletroforeses em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tampão tris-acetato-EDTA) 1X conforme descrito no item anterior. Para os produtos purificados, foram aplicados no gel de agarose 3  $\mu$ L do DNA purificado adicionado de 1  $\mu$ L do *loading buffer* e em um dos orifícios de cada gel foram acrescentados 2  $\mu$ L do padrão de DNA contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (100 pb DNA ladder, Invitrogen).

### 3.3.3 Sequenciamento dos genes

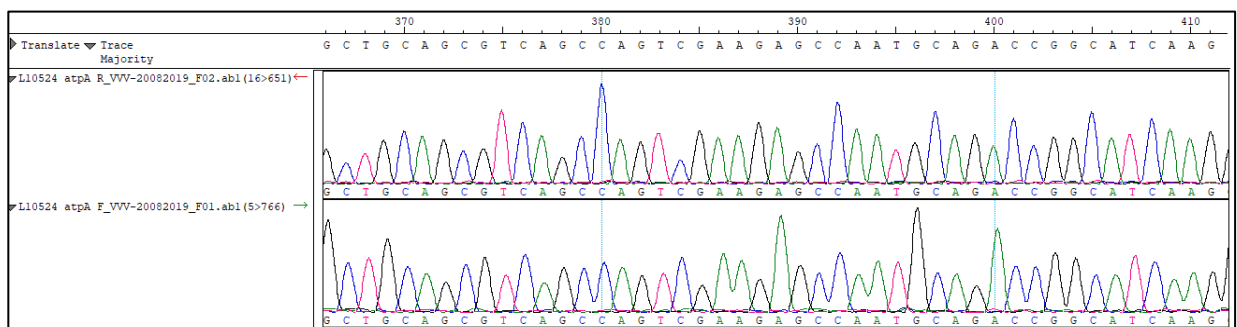
O DNA purificado na etapa anterior foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento realizada com o sistema comercial Big Dye Terminator Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente os produtos desta reação foram precipitados com 80 µL de uma solução com 75% de isopropanol, centrifugados por 45 minutos a 12.000 g a 21° C e os sobrenadantes desprezados pela inversão cuidadosa da placa em papel de filtro. A placa foi invertida em cima de outro papel de filtro, centrifugada por 1 minuto a 6.000 g a 21°C e o processo de secagem foi realizado no termociclador a 75°C por 5 minutos. Os sedimentos foram então ressuspensos em 10 µL de formamida, centrifugados por 1 minuto a 6.000 g a 21°C, incubados a 95°C por 5 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo. Após a corrida no sequenciador (ABI PRISM 3100 Applied Biosystems DNA Sequencer) as sequências nucleotídicas foram analisadas.

### 3.3.4 Edição das sequências e submissão ao banco de dados PubMLST

Após o sequenciamento, as sequências *forward* e *reverse* dos sete genes de cada linhagem foram alinhadas e editadas no *software* Lasergene SeqMan (DNASTAR), onde foi gerado um cromatograma (**Figura 2**) e um arquivo em formato fasta para de cada gene analisado.

Figura 2 – Exemplo de um cromatograma gerado pelo sequenciamento de genes.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

As sequências nucleotídicas obtidas que foram salvas em formato fasta, foram submetidas ao banco de dados PubMLST para *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, o qual faz um alinhamento das sequências de interesse e compara com as sequências de referência de cada gene no banco de dados. Após este alinhamento realizado pelo PubMLST foram determinados o número do alelo de cada gene e o número de ST de cada linhagem, quando já existente no banco de dados.

Linhagens que tiveram novos ST, ou seja, ST que não existiam no banco de dados, tiveram seus respectivos cromatogramas e sequências, em formato fasta, enviados para o curador do PubMLST no *site* do banco de dados para que fossem analisados e determinados um novo número de ST.

### 3.4 Análise dos dados de *Multilocus Sequence Typing*

#### 3.4.1 Análise da distância alélica dos ST pela ferramenta *GrapeTree*

A relação de distância entre as linhagens pode ser inferida pela diferença de alelos que existe entre cada uma delas. Os dados de MLST de cada linhagem depositados no banco PubMLST foram avaliados, pela ferramenta *GrapeTree*, cujo acesso foi realizado no referido *site* (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>). Para tal, foi seguida a sequência: *isolates – Third party tools – GrapeTree*.

Para a análise, os números de identificação (ID) de cada linhagem depositada no banco de dados do MLST foram selecionados e a ferramenta calculou a distância entre os alelos de cada linhagem, gerando um diagrama de círculos, no qual pode-se visualizar o número de cada ST dentro de cada círculo, a quantidade de linhagens que apresentaram o referido ST, representado pelas cores diferentes e tamanho dentro dos círculos, e a diferença de alelos que são mostradas em números nas linhas que os ligam.

As linhagens foram selecionadas usando os seguintes critérios: todas as linhagens brasileiras deste estudo e as isoladas em outros estudos já realizados no Brasil, além das linhagens isoladas em diferentes países e depositadas no banco de dados de MLST entre 2015 e 2019. Além destas, as linhagens mais relacionadas segundo a análise realizada pela ferramenta iTOL tiveram os ID selecionados e incluídos.

#### 3.4.2 Análise filogenética dos dados utilizando a ferramenta iTOL

A análise filogenética realizada neste estudo se baseou nos resultados obtidos pela ferramenta iTOL que é disponibilizada pelo PubMLST. O iTOL utiliza as sequências nucleotídicas concatenadas dos ST das linhagens depositadas no banco de dados. Esta ferramenta utiliza o método de agrupamento *neighbor-joining* e

possibilita a sobreposição de dados das linhagens. Para acessar o iTOL foi seguida a sequência: (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) – *isolates* – *Third party tools* – *iTOL*.

Para a análise, os dados de todas as linhagens da espécie *C. diphtheriae* depositadas no banco de dados do PubMLST foram selecionados para gerar uma árvore filogenética com os dados das linhagens sobrepostos. Foi realizada outra análise considerando apenas a espécie *C. diphtheriae* excluindo as linhagens da nova espécie descrita como *C. belfantii*. O iTOL permitiu gerar árvores filogenéticas circulares, lineares e não enraizadas.

### **3.5 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, pela Plataforma Brasil e foi aprovado segundo o registro CAAE no. 25847614.8.0000.5259 e parecer número 3.728.797.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Linhagens bacterianas e identificação

Todas as 47 linhagens bacterianas avaliadas neste estudo, foram oriundas do Brasil, das regiões: Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, do período de 1980 a 2019. As linhagens foram identificadas como *C. diphtheriae* pelo LDCIC. A confirmação da identificação da espécie realizada pela CBAS, utilizando a análise da sequência do gene *rpoB*, mostrou que a similaridade de todas as linhagens estudadas comparando com a cepa tipo de *C. diphtheriae*, apresentou valores acima de 95,0%. Os valores de similaridade variaram de 99,02 a 100,00% exceto para a linhagem 3683 cujo valor foi 99,89 %. A linhagem 3683 (*C. belfantii*) apresentou similaridade de 99,89%.

### 4.2 Alelos e sequências tipo das linhagens de *C. diphtheriae*

Os alelos determinados para os sete genes de cada linhagem analisada neste estudo e seus respectivos números de ST estão mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Linhagens bacterianas com os respectivos perfis de alelos e sequência tipo (ST) (continua).

Número LDCIC	Número dos alelos dos genes							Sequência tipo (ST)
	<i>atpA</i>	<i>dnaE</i>	<i>dnaK</i>	<i>fusA</i>	<i>leuA</i>	<i>odhA</i>	<i>rpoB</i>	
9	3	2	131	4	3	2	4	<b>634</b>
90	3	2	3	6	3	3	2	67
371	3	2	2	4	3	32	6	172
477	2	2	2	3	11	64	4	536
812	3	2	123	38	43	2	4	<b>635</b>
813	3	2	123	38	43	2	4	<b>635</b>
814	3	2	2	4	3	32	6	172
1104	3	2	2	4	3	32	6	172
1139	5	2	47	3	3	74	9	<b>637</b>
1176	5	2	47	3	3	74	9	<b>637</b>
1178	5	2	47	3	3	74	9	<b>637</b>
1219	5	2	47	3	3	74	9	<b>637</b>
1233	2	2	13	19	3	4	3	<b>638</b>
1491	3	4	8	1	7	2	9	173
1624	3	2	123	38	43	76	4	<b>639</b>



Tabela 4 - Linhagens bacterianas com os respectivos perfis de alelos e sequência tipo (ST) (continuação).

Número LDCIC	Número dos alelos dos genes							Sequência tipo (ST)
	<i>atpA</i>	<i>dnaE</i>	<i>dnaK</i>	<i>fusA</i>	<i>leuA</i>	<i>odhA</i>	<i>rpoB</i>	
1641	3	2	13	4	3	75	3	<b>640</b>
1911	3	2	36	80	38	3	3	<b>650</b>
2494	2	2	132	3	3	2	3	<b>641</b>
2495	2	2	124	3	3	2	3	584
2496	3	1	13	16	38	2	9	212
2497	3	1	13	16	38	2	9	212
2520	2	1	37	19	24	3	4	175
2587	3	1	13	16	38	73	9	<b>651</b>
2626	3	2	124	71	80	2	4	<b>642</b>
2628	3	2	124	71	80	2	4	<b>642</b>
2634	2	2	36	19	3	3	6	171
2635	2	2	36	19	3	3	6	171
2636	2	2	36	19	3	3	6	171
2666	3	2	3	6	3	3	2	67
2667	3	2	3	6	3	3	2	67
2685	2	4	17	4	81	5	2	<b>643</b>
2717	28	2	60	2	3	3	2	<b>636</b>
2893	5	2	47	3	3	74	9	<b>637</b>
2962	3	1	110	19	20	3	60	<b>647</b>
3681	2	4	17	4	7	5	2	176
3683	6	7	10	79	82	12	10	<b>644</b>
3684	3	2	13	38	14	33	4	174
5003	3	2	13	1	3	75	4	<b>645</b>
5015	3	2	131	4	3	2	4	<b>634</b>
L10524	3	2	13	4	3	2	3	<b>679</b>
MA 131	2	4	17	4	7	5	2	176
MA 136	3	4	133	3	7	1	4	<b>649</b>
MA 150	2	4	17	4	7	5	2	176
MA 19	2	4	17	4	7	5	2	176
MA 23	2	4	17	4	7	5	2	176
MA 52	2	4	17	4	7	5	2	176
HC06	2	1	32	38	13	3	3	615

Legenda: Os ST novos foram apresentados em negrito.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

### 4.3 Análise da tipagem molecular por MLST

As 47 linhagens caracterizadas por MLST foram agrupadas em 28 ST diferentes: ST67, ST171, ST172, ST173, ST174, ST175, ST176, ST212, ST536, ST584, ST 615, ST634, ST635, ST636, ST637, ST638, ST639, ST640, ST641, ST642, ST643, ST644, ST645, ST647, ST649, ST650, ST651 e ST679. Dentre estes ST, 17 foram ST novos, ou seja, tiveram pelo menos algum alelo, ou uma combinação de alelos que não existia no banco de dados do PubMLST, que por sua vez, atribuiu números de ST novos, que são: ST634, ST635, ST636, ST637, ST638, ST639, ST640, ST641, ST642, ST643, ST644, ST645, ST647, ST649, ST650, ST651 e ST679 (**Tabela 4**). No total, 19 ST foram relacionados a uma única linhagem e nove ST foram atribuídos a mais de uma linhagem (**Tabela 4**). Apenas o ST176 foi atribuído a linhagens isoladas em mais de um estado brasileiro. Em 2010, linhagens do ST176 com toxigenicidade positiva causaram o surto de difteria no Maranhão e foi verificado também o mesmo ST em 2012 em Santa Catarina, com toxigenicidade positiva, causando difteria (**Tabela 1**).

Alguns ST ocorreram em anos diferentes, como o ST637, que foi um novo ST determinado neste estudo, ou seja não houve a caracterização deste ST em nenhum país até o momento. O ST637 foi determinado em cinco amostras do Rio de Janeiro: três do ano de 2002, um de 2003 e um de 2018. Os sítios de infecção foram variados entre amostras isoladas de lesão de perna, no cérebro, lesão no maxilar e sangue. Todas foram linhagens atoxigênicas. Outros ST, como ST171, ST172, ST176, ST634 e 637 também foram atribuídos a linhagens isoladas em anos diferentes (**Tabelas 1 e 4**).

#### **4.4 Toxigenicidade das linhagens e quadro clínico**

Quanto a presença ou ausência do gene *tox* dos isolados de *C. diphtheriae* estudados, de 1980 a 2019 no Brasil, houve um predomínio de linhagens atoxigênicas na amostragem avaliada. Dentre as 47 linhagens analisadas neste período, 32 foram atoxigênicas, sendo 26 só na cidade do Rio de Janeiro, uma em Minas Gerais e cinco no nordeste (Pernambuco, Bahia e Maranhão). Estas linhagens foram isoladas de diferentes quadros clínicos, sendo sete linhagens isoladas de casos de endocardite, oito de infecção de feridas de pele e cirúrgica, quatro de pneumonia, quatro de difteria e nove de outros quadros clínicos.

As linhagens toxigênicas foram representadas por 15 linhagens, sendo dez isoladas na região Nordeste (Pernambuco e Maranhão) e as cinco restantes isoladas no Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Acre. Catorze linhagens foram isoladas de casos de difteria e uma linhagem de um caso de difteria cutânea (**Tabela 1**).

#### **4.5 Relação alélica entre as sequências tipo utilizando a ferramenta *GrapeTree***

A ferramenta *GrapeTree* do banco de dados PubMLST mostrou a relação dos perfis alélicos das linhagens depositadas no banco de dados PubMLST incluindo os 28 ST atribuídos as linhagens deste estudo (**Figura 3**). A análise realizada mostra uma ampla diversidade de ST (perfis alélicos) nas linhagens avaliadas com as diferenças de alelos entre os ST (**Tabela 1, Figura 3**). Alguns ST com variantes de um único *locus* (*single locus variant* – SLV) foram determinados. Os SLV contêm apenas um alelo de diferença entre si, e conseqüentemente compartilham alta similaridade genética. Nas linhagens estudadas, os ST que possuem um único alelo de diferença foram: ST176/ ST643; ST212/ ST651; ST584/ ST641; ST635/ ST639 e ST640/ ST679. Dentre estes, ST176/ST643, ST212/ST651 e ST584/ST641, foram atribuídos a linhagens toxigênicas que causaram difteria. Já as linhagens atoxigênicas classificadas como ST635 e ST639 causaram pneumonia e as linhagens ST640 e ST679 foram isoladas de outras infecções (**Tabela 1 e 5, Figura 3**).

Os ST mais similares foram comparados em relação a diferença de alelos e as diferenças nucleotídicas dos alelos divergentes (**Tabela 5**). As comparações foram feitas utilizando ST deste trabalho e ST previamente estudados por Viguetti et al. (2012), como ST80 e 128. Os ST com um alelo diferente apresentaram de um a cinco nucleotídeos diferentes. Notou-se que os ST128 e 615, que têm três *locus* variantes entre si, possuem um total de 12 nucleotídeos diferentes, enquanto os ST 172 e 67, com quatro *locus* variantes, possuem apenas dez nucleotídeos distintos (**Tabela 5**). Também ficou evidente a relação entre os ST640 e 645 e os ST80 e 615, os quais possuem dois *locus* variantes entre si, porém apresentam a diferença de oito e seis nucleotídeos, respectivamente (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Número de nucleotídeos diferentes entre alelos de sequências tipo relacionadas.

Sequênciatipo (ST)	Alelosdiferentes	Número total de nucleotídeos diferentes
635 x 639	<i>odhA</i>	1
584 x 641	<i>dnaK</i>	1
212 x 651	<i>odhA</i>	1
176 x 643	<i>leuA</i>	2
679 x 640	<i>odhA</i>	5
640 x 645	<i>fusA</i> e <i>rpoB</i>	8
80 x 615	<i>fusA</i> e <i>rpoB</i>	6
128 x 615	<i>dnaK</i> , <i>fusA</i> e <i>rpoB</i>	12
172 x 67	<i>dnaK</i> , <i>fusA</i> , <i>rpoB</i> e <i>odhA</i>	10

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

#### 4.6 Análise filogenética utilizando a ferramenta iTOL

A análise filogenética gerada pela ferramenta iTOL está apresentada na **Figura 4**. Foram utilizadas todas as linhagens depositadas como *C. diphtheriae* disponíveis no banco de dados do PubMLST, inclusive as linhagens brasileiras que fazem parte deste estudo e que também foram depositados neste banco de dados. As linhagens de *C. diphtheriae* do biotipo belfanti, que atualmente pertencem a outra espécie, *C. belfantii*, se agruparam separadamente das demais linhagens da referida espécie. Na **Figura 4A** a mesma análise foi representada por uma árvore filogenética não enraizada, onde os nós com mais de uma linhagem foram colapsados para facilitar a visualização dos principais clados. Apenas uma linhagem brasileira pertenceu a *C. belfantii* e foi atribuída a esta o novo ST644 (**Figura 4B**).

Para facilitar a análise das linhagens pertencentes a *C. diphtheriae*, as linhagens de *C. belfantii* foram retiradas da análise posterior (**Figura 5**). A **Figura 5** mostra que as linhagens da espécie *C. diphtheriae* foram agrupadas em quatro clados. As linhagens deste estudo se mostraram dispersas na análise e se distribuíram por três dos quatro clados, indicando grande diversidade genética. Para facilitar a visualização e análise do relacionamento filogenético das linhagens de *C. diphtheriae* na análise, a **Figura 5** foi ampliada dando origem as **Figuras 5A, 5B, 5C e 5D**.

Figura 3 - Representação gráfica da distância entre ST das linhagens de *C. diphtheriae*, incluindo as do presente estudo utilizando a ferramenta GrapeTree. Os ST circulados foram caracterizados neste estudo e as cores dos círculos estão de acordo com as cores dos clados da ferramenta iTOL. O ST marcado com quadrado roxo é *C. belfantii*, e marcado com quadrado preto foi um ST isolado na Venezuela.

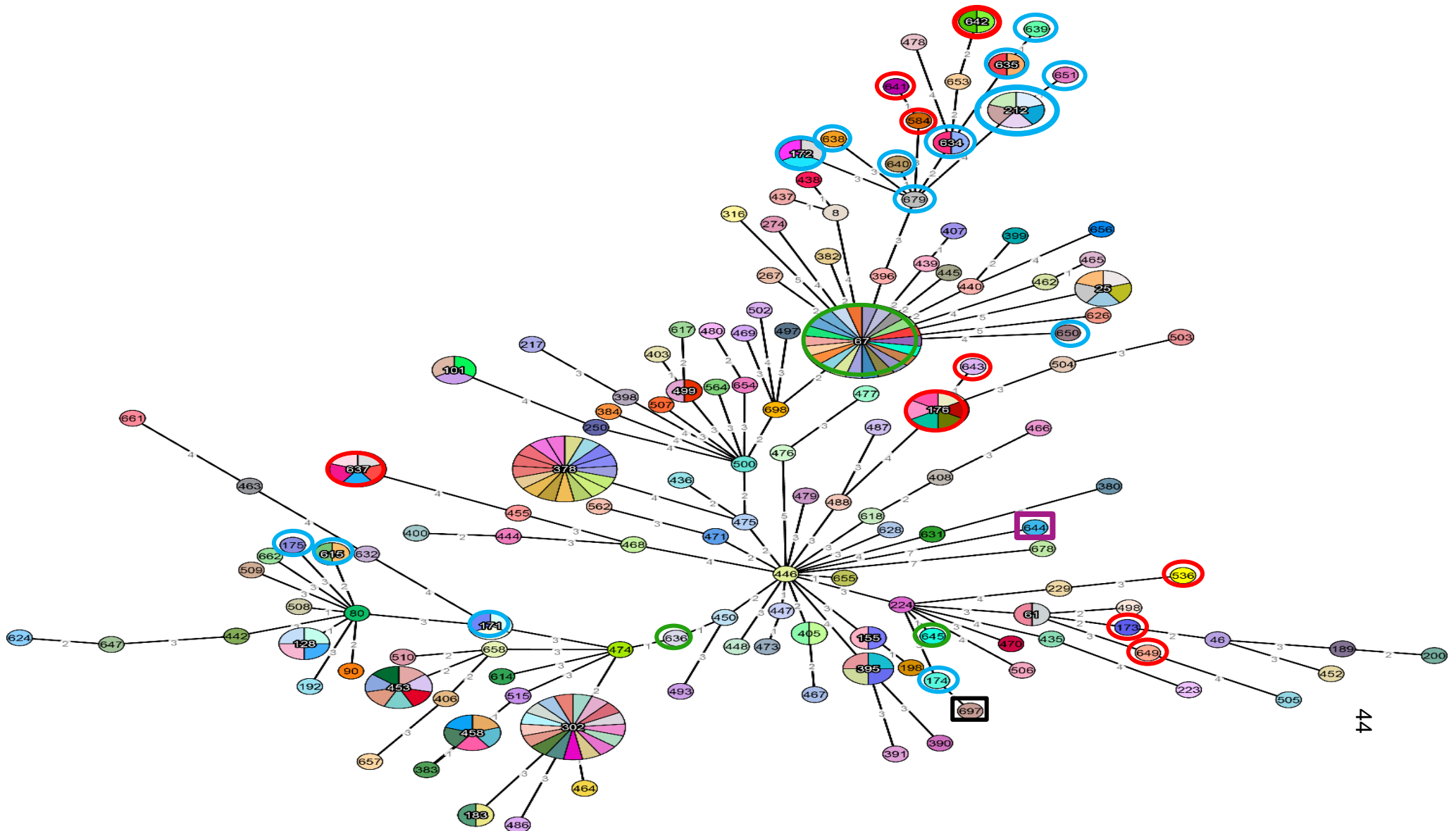


Figura 4 - Análise filogenética gerada pela ferramenta iTOL, utilizando as linhagens de *C. diphtheriae* do PubMLST. O agrupamento destacado inclui a cepa tipo da espécie *C. belfantii* que foi depositada no referido banco de dados.

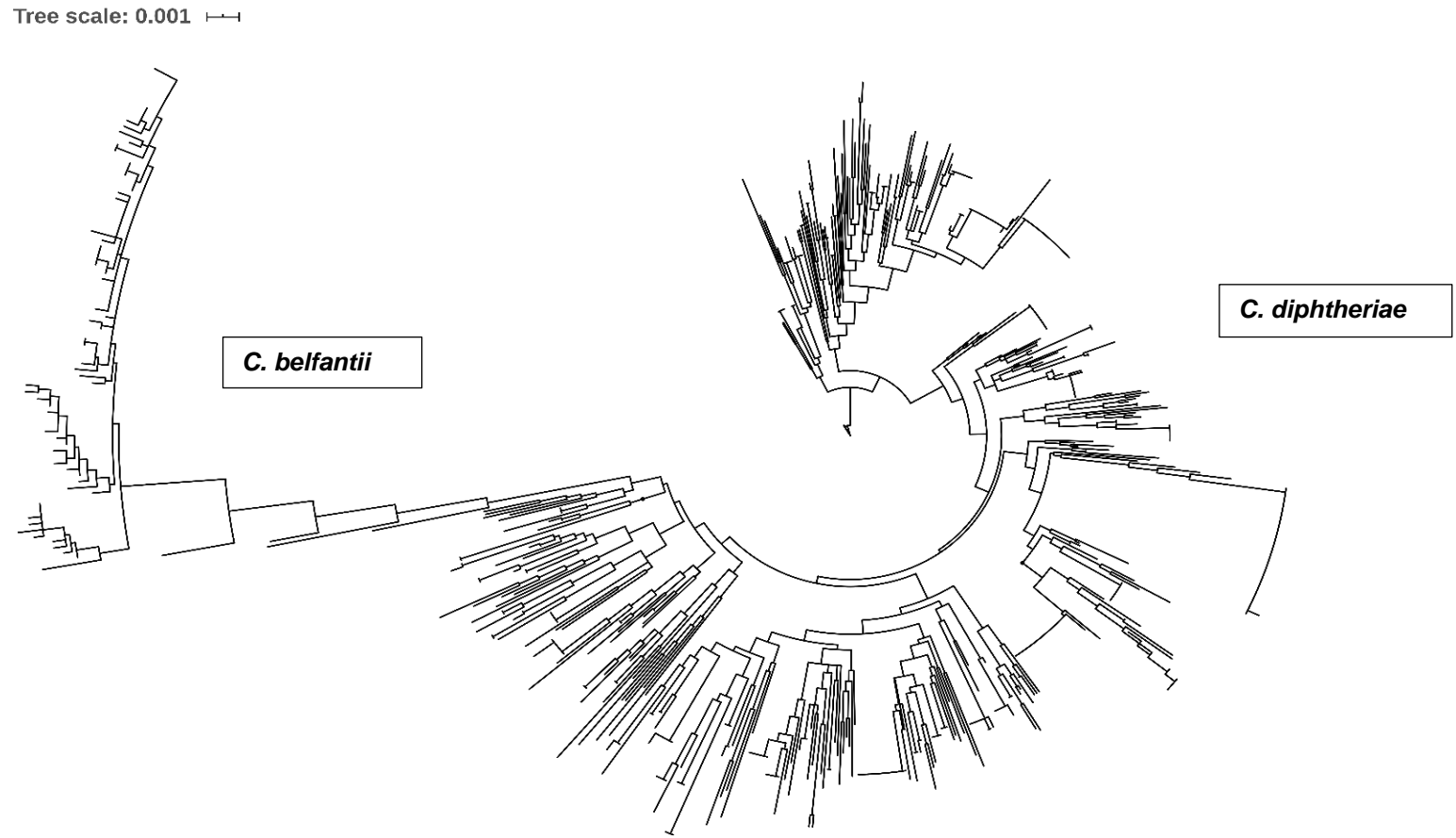


Figura 4A - Análise filogenética não enraizada utilizando as linhagens de *C. diphtheriae* do PubMLST. Os principais clados estão destacados sinalizados na figura.

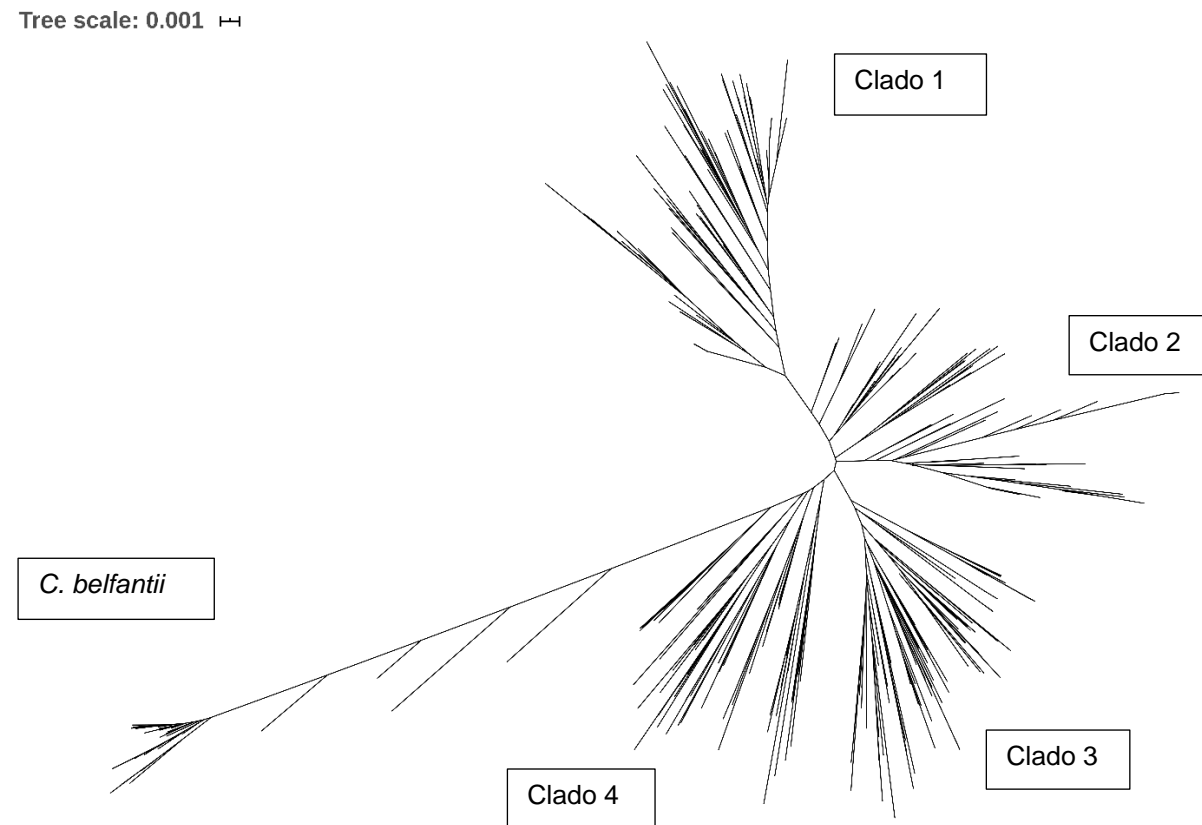


Figura 4B - Imagem ampliada da figura 4 mostrando o clado referente a espécie *C. belfantii*. A linhagem brasileira 3683 (ST644), pertencente a espécie *C. belfantii* está destacada em vermelho.

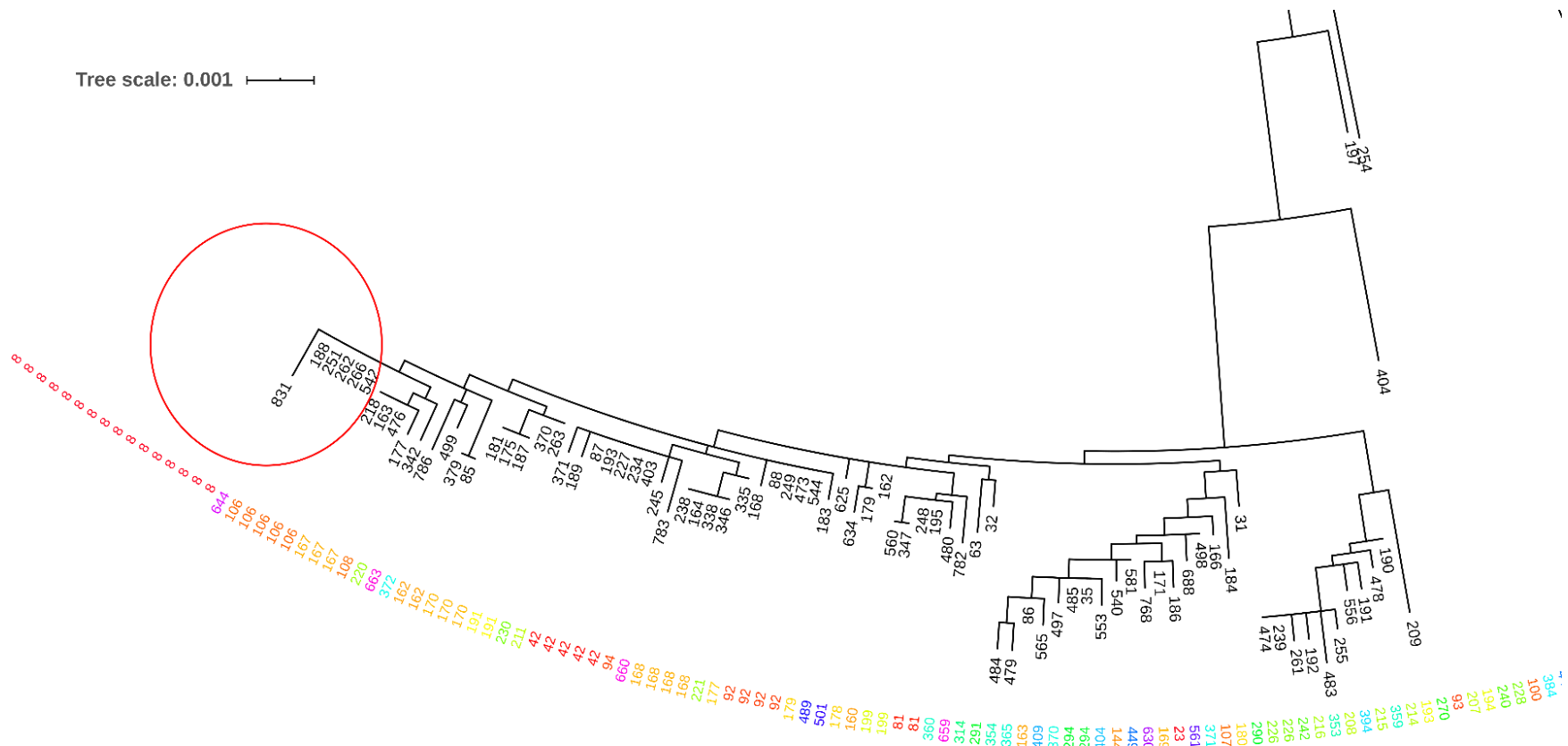
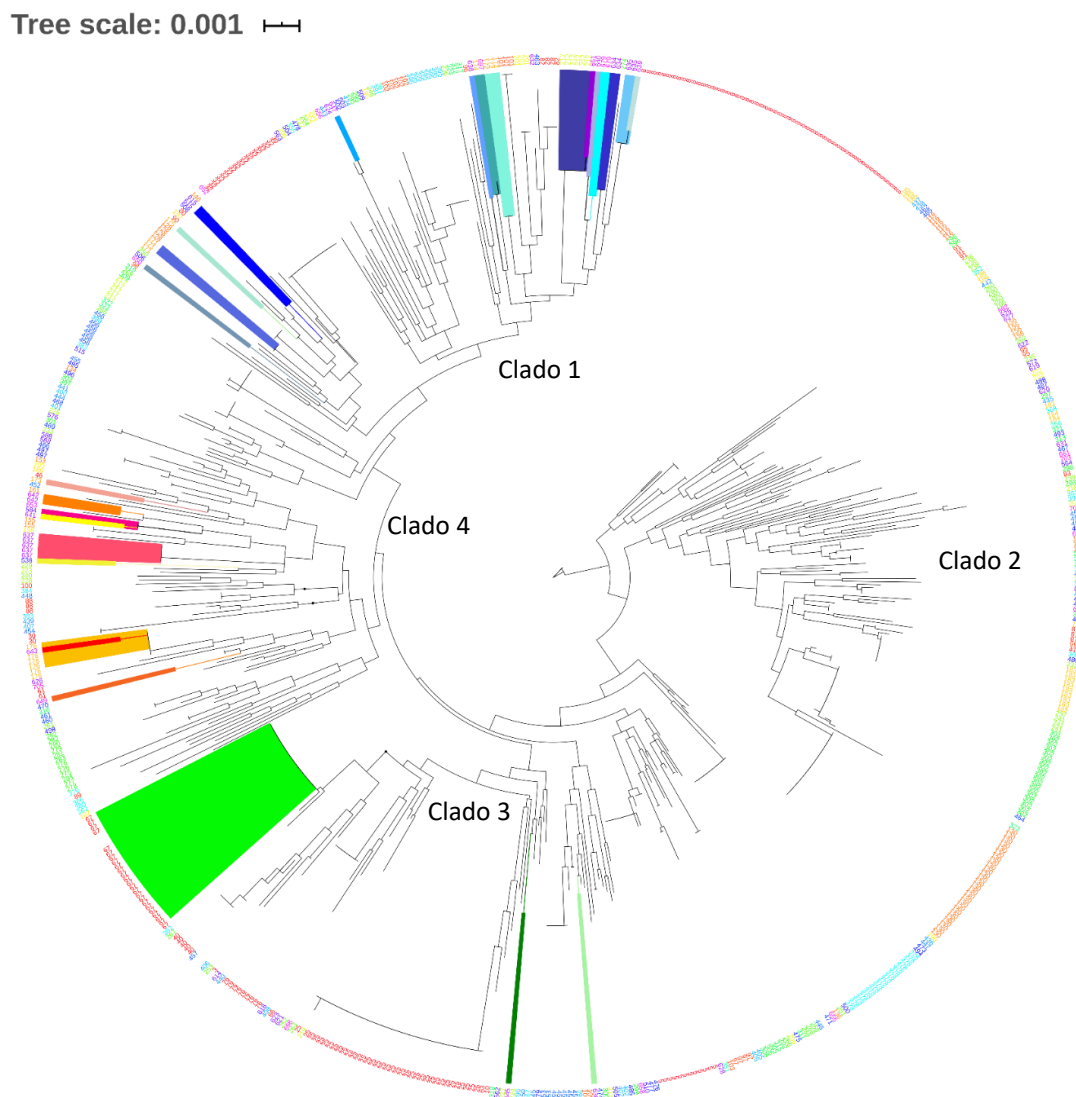




Figura 5 - Análise filogenética das linhagens da espécie *C. diphtheriae* depositadas no banco PubMLST utilizando a ferramenta iTOL. As linhagens foram agrupadas em quatro clados. As linhagens deste estudo foram agrupadas nos clados 1 (cores tons de azul), 3 (cores tons de verde) e 4 (cores tons de vermelho e amarelo)



As linhagens pertencentes aos ST650, ST171, ST175, ST615, ST647, ST638, ST174, ST212, ST172, ST651, ST640, ST679, ST634, ST635 e ST639 ficaram distribuídas no clado 1 (**Figura 5A**). A linhagem deste estudo, isolada mais recentemente (2962), de ferida em um paciente em Minas Gerais em 2019, foi classificada como pertencente ao ST647. De acordo com esta análise filogenética,

esta linhagem está mais relacionada a uma linhagem toxigênica isolada na Bélgica em 2018 pertencente ao ST624 (**Figura 5A**). Esta análise mostrou que as linhagens atribuídas aos ST639, ST635, ST634, ST679, ST640, ST651 e ST212, possuem o mesmo ancestral. Todos esses, por sua vez, ficaram agrupados em um mesmo ramo, sendo os ST: 639, 635, 634 e 640 representantes de linhagens atoxigênicas isoladas no Rio de Janeiro, além do ST679 atribuído a uma linhagem atoxigênica isolada no Bahia. As linhagens dos ST635 e ST639 apresentam maior similaridade genética entre si, com diferença de apenas um alelo utilizando a metodologia de MLST. Os ST651 e ST212 atribuídos a linhagens isoladas em São Paulo no ano de 2014 e em Pernambuco no ano de 2013, respectivamente, demonstraram alto grau de relacionamento filogenético, também com diferença de apenas um alelo (**Tabela 5**). As linhagens classificadas como ST172 foram isoladas no Rio de Janeiro, são atoxigênicas e ficaram agrupadas separadamente em outro ramo. Assim como, as linhagens classificadas como pertencentes aos ST174 e ST638 se agruparam também no clado 1 em outro ramo (**Figura 5A**).

Ainda no clado 1, verificamos o relacionamento filogenético das linhagens pertencentes aos ST: 171, 175, 615 e 650 que foram agrupadas em outro ramo. Todas as linhagens dos referidos ST são atoxigênicas e foram isolados no Rio de Janeiro (**Figura 5A**).

Apenas linhagens deste estudo classificadas como ST67, ST636 e ST645 foram agrupadas no clado 3 e não se mostraram relacionadas. Duas linhagens pertencentes aos novos ST636 e ST645, respectivamente, são atoxigênicas. Três linhagens foram atribuídas ao ST67, uma toxigênica isolada no Rio de Janeiro em 1980 e duas atoxigênicas isoladas de endocardite em 2015, também no Rio de Janeiro (**Figura 5B**).

No clado 4 foram agrupadas linhagens toxigênicas e não toxigênicas isoladas no Rio de Janeiro, Maranhão e Pernambuco. As linhagens atribuídas aos ST: 173, 176, 536, 584, 637, 641, 642, 643 e 649 foram agrupadas neste clado (**Figura 5C**). Nesta análise, podemos observar linhagens classificadas em diferentes ST distribuídas em várias ramificações. Entretanto, os ST: 584, 641 e 642 atribuídos a linhagens isoladas em Pernambuco em 2013 e em 2015 se agruparam. A análise filogenética mostrou proximidade genética muito relevante entre as linhagens toxigênicas dos ST584 e ST641 isoladas de dois casos de difteria em Pernambuco em 2013, os referidos ST se diferenciam por apenas um alelo. Outra ramificação

também foi observada contemplando linhagens toxigênicas que causaram surto de difteria clássica no Maranhão em 2010 e em Pernambuco em 2015, que foram classificadas como pertencentes aos ST176 e ST643, respectivamente. As linhagens classificadas como ST173, ST536, ST637, ST642 e ST649 são não toxigênicas e não são relacionadas entre si (**Figura 5C**).

Figura 5A - Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 1 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons azuis. ST toxigênicos estão indicados com setas.

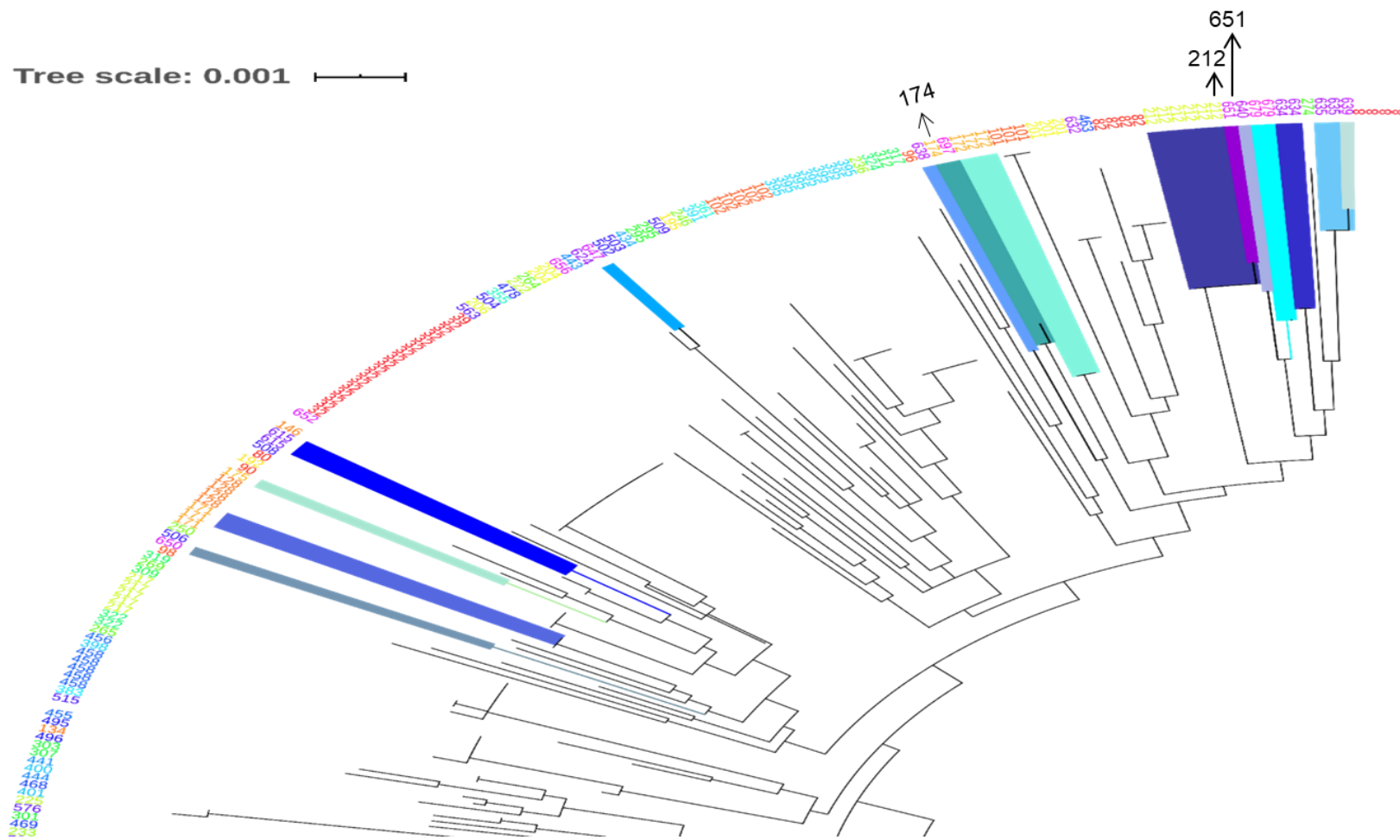


Figura 5B - Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 3 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons verdes. ST toxigênico está indicado com seta.

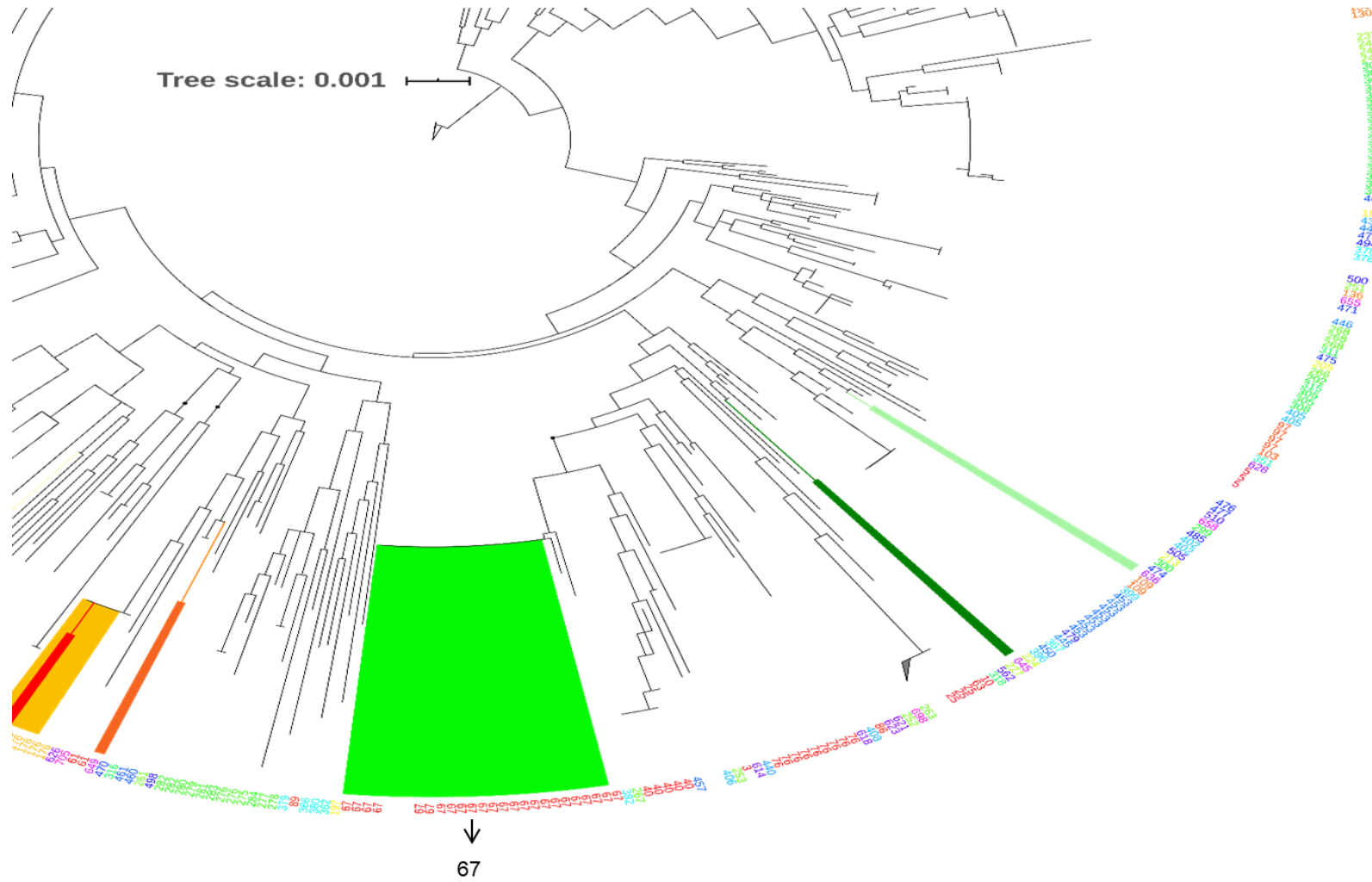
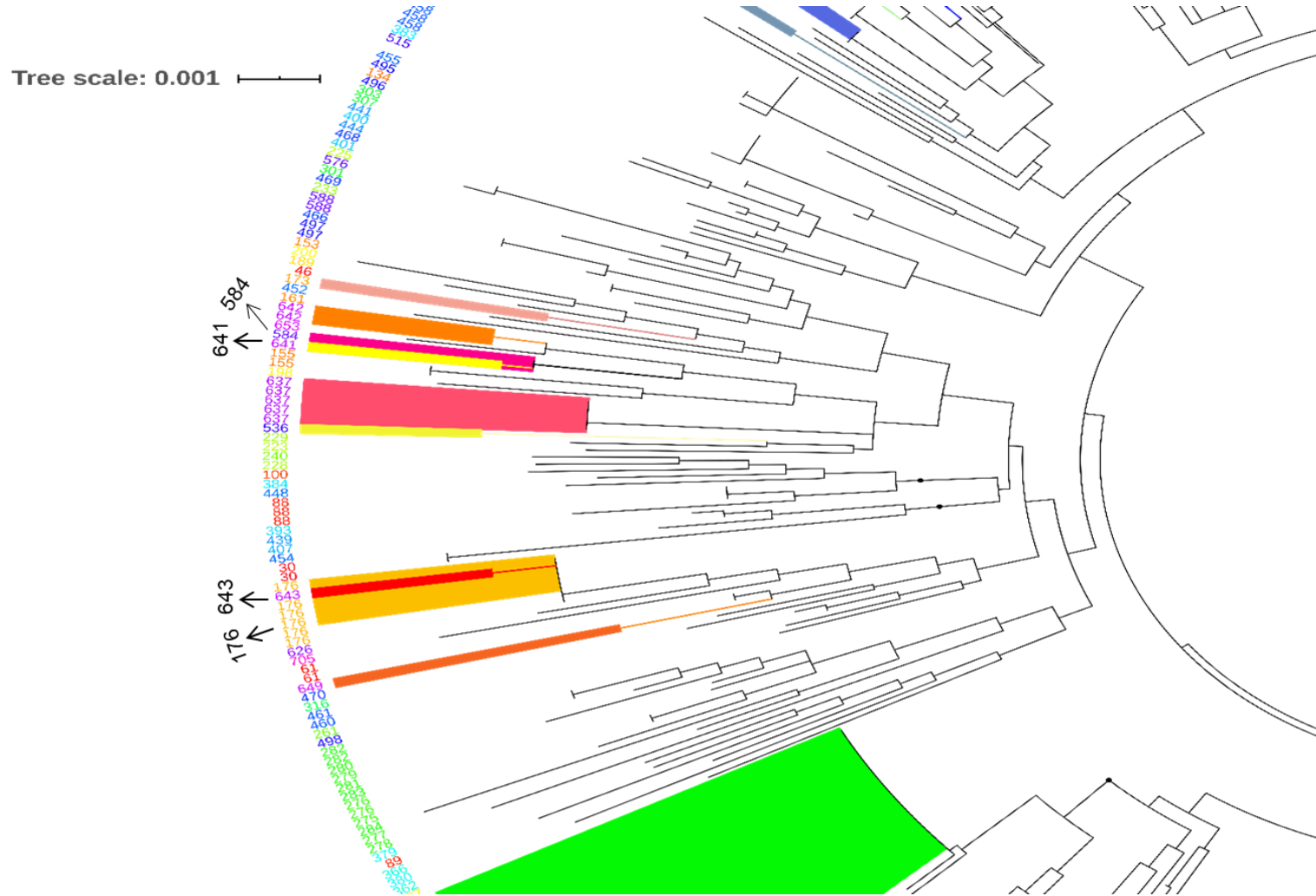


Figura 5C - Imagem ampliada da figura 5 mostrando o clado 4 e o relacionamento de linhagens deste estudo na análise filogenética realizada utilizando a ferramenta iTOL. Os ST das linhagens deste estudo estão destacados com cores de tons vermelhos e amarelos. ST toxigênicos estão indicados com setas.



## 5 DISCUSSÃO

A difteria é uma doença reemergente, pouco conhecida atualmente em países desenvolvidos, já tendo sido, porém, causadora de grandes epidemias que levaram à muitas mortes na era pré-vacinal. Poucos estudos epidemiológicos foram realizados acerca da difteria no Brasil, em vista de se tratar de uma doença imunoprevenível, conseqüentemente tornou-a negligenciada (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2017).

É comum que as pessoas acreditem, erroneamente, que pelo fato de não presenciarem mais esta doença, não há necessidade de se prevenirem com a vacina. Fato é que quando não se percebe a circulação de uma determinada doença na população, para qual existe vacina, isso é devido à elevadas taxas de cobertura vacinal para aquela doença (CONASS, 2017, BRONIATOWSKI et al., 2018). Caso a cobertura vacinal seja reduzida podem ocorrer surtos. A OMS e o Ministério da Saúde apontaram que desde 2016 a cobertura vacinal referente a terceira dose da vacina contra difteria, tétano e pertussis (DTP3) vem caindo no Brasil, se mantendo abaixo de 90%, sendo que de acordo com o Ministério da Saúde, a cobertura preconizada é de 95% (SAID, 2019, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Por outro lado, a doença acaba recebendo menor atenção também dos profissionais de saúde. Poucos laboratórios buscam a presença de *C. diphtheriae* em espécimes clínicos, ou por não cogitarem a hipótese de uma infecção por *C. diphtheriae*, ou simplesmente por não possuírem meios de cultura apropriados para o isolamento adequado do micro-organismo, assim como, o manejo clínico da parte de médicos, que cada vez mais se tornam despreparados para o diagnóstico. Resumindo, a queda da cobertura vacinal, os movimentos antivacinas, aliadas à um despreparo dos profissionais da saúde no diagnóstico da doença, são fatores que podem tornar a população mais exposta e conseqüentemente aumentar a chance de novos surtos ocorrerem (BRONIATOWSKI et al., 2018).

Apesar da difteria ser uma doença de notificação compulsória imediata (BRASIL, 2018a), existe uma expressiva subnotificação desta doença no país, o que muitas vezes acontece devido a precariedade de diagnóstico clínico e/ou laboratorial. Na amostragem considerada neste estudo temos linhagens toxigênicas que não estão contempladas na lista de “Casos Confirmados de Difteria no Brasil” do Ministério da Saúde (<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/difteria>), uma linhagem

toxigênica isolada de um caso de difteria em Santa Catarina em 2012 e três linhagens toxigênicas isoladas de quatro casos de difteria em Pernambuco em 2013. Pelos dados do Ministério da Saúde não houve caso de difteria em Santa Catarina e foi registrado apenas um caso dos quatro casos da doença que foram confirmados pelo laboratório LDCIC/UERJ em 2013.

O Brasil é um país que apresenta características que favorecem a endemicidade da difteria, como a presença de regiões com condições sócio-econômicas precárias onde há maior aglomeração de pessoas, o que facilita a transmissão do bacilo, além do clima tropical (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; AZEVEDO, 2013; BRASIL, 2014). Um estudo australiano feito por May et al. (2013), demonstrou o quanto viagens a regiões tropicais estavam associadas à infecção por *C. diphtheriae*. O estudo apontou que de 63 pacientes que tiveram histórico conhecido de viagem, 70% tinham histórico de *C. diphtheriae* presente em uma ferida não cicatrizada, obtida durante alguma viagem para um destino tropical (MAY; MCDUGALL; ROBSON, 2013). No Brasil, o Nordeste é uma das regiões que apresenta condições sócio-econômicas menos favorecidas, e é inclusive onde estão presentes os dois estados que apresentaram surtos mais recentes de difteria no Brasil: Maranhão em 2010 e Pernambuco em 2015.

Em países desenvolvidos, poucos casos de difteria causados por linhagens toxigênicas acontecem, e quando ocorrem, na maioria das vezes são casos importados. Na Nova Zelândia, país em que raramente são notificados casos de difteria, ocorreram dois casos de linhagens toxigênicas provenientes de refugiados do Afeganistão em 2015 (REYNOLDS et al., 2016). Países europeus, como Alemanha, Suíça e Bélgica também já reportaram casos importados de difteria (LINDHUSEN-LINDHÉ, DOTEVALL, BERGLUND, 2012; MEINEL et al., 2016; MARTINI et al., 2019).

Este estudo visou compreender melhor a epidemiologia de *C. diphtheriae* no Brasil utilizando a metodologia de MLST. A análise de diferenças alélicas entre os ST foi realizada, mas como esperado, não foi eficiente para o estudo de casos ao longo de vários anos, pois por se tratar de uma espécie com altas taxas de recombinação, provavelmente pode ter acumulado diversas mutações nos genomas. Para a espécie avaliada as inferências evolutivas foram realizadas utilizando a análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas concatenadas do esquema proposto pelo PubMLST.



As linhagens brasileiras de *C. diphtheriae* estudadas, demonstraram que se trata de uma espécie com alta diversidade genética, o que pôde ser observado pela variedade de ST encontrados. Quarenta e sete linhagens foram classificadas em 28 ST. A diversidade genética existente neste micro-organismo já foi previamente verificada em estudos, como o de Bolt et al. (2010), que identificou evidências para recombinação em *C. diphtheriae*, apontadas pelas discordâncias significativas das árvores filogenéticas entre todos os alelos do MLST, denotando que haja relevante diversidade dentro da espécie, uma vez que, em populações clonais, a relação filogenética para todos os *loci* deve ser a mesma (BOLT et al., 2010). Altas taxas de recombinação em *C. diphtheriae* podem ser explicadas pelo fato de ocorrerem recombinações com maior frequência em bactérias que colonizam o trato respiratório superior, pois é um nicho de uma grande variedade de bactérias, propiciando oportunidades para haver recombinação gênica (GROSSE-KOCK et al., 2017).

Viguetti et al. (2012) realizaram um estudo utilizando a tipagem por MLST para avaliar linhagens brasileiras. Oito linhagens de *C. diphtheriae* foram avaliadas, sendo uma toxigênica isolada de um caso de difteria e as demais atoxigênicas isoladas de infecções invasivas. Naquele estudo foram encontrados seis ST novos: ST171, ST172, ST173, ST174, ST175 e ST176. Todos estes ST foram encontrados também nas linhagens deste estudo e ainda não foram descritos em outros países de acordo com o banco do PubMLST. Dos 28 ST encontrados no presente estudo, 17 ST são novos, isto é, aproximadamente 61% dos ST não foram encontrados em linhagens da espécie em outros países até o momento. Além disso, se considerarmos os ST descritos para linhagens brasileiras por Viguetti et al. (2012), outros seis ST ainda não foram descritos em outros países. Apenas 4 ST (ST67, ST212, ST584 e ST615) foram atribuídos a linhagens deste estudo e a linhagens isoladas em outros países. O ST67 foi o mais compartilhado com outros países, ele ocorreu na França em 2000, Bélgica em 2017, Filipinas em 2016 e 2017, Rússia em 2012, 2015, 2016 e 2018, e no Vietnã em 2016, segundo levantamento realizado no banco de dados PubMLST. No presente estudo, este ST foi apresentado em três linhagens isoladas no Rio de Janeiro, uma toxigênica que causou lesão cutânea em 1980, e as outras duas não toxigênicas causando endocardite em 2015. De acordo com os dados do banco PubMLST, duas linhagens toxigênicas isoladas na Alemanha e na França em 2011 foram classificadas também como pertencentes ao ST212 e neste estudo duas linhagens classificadas como ST212 foram isoladas de

dois casos de difteria em Pernambuco em 2013. Os outros dois ST, ST584 e ST615 foram isolados também isolados na Alemanha e na Inglaterra respectivamente, no ano de 2018.

No presente estudo, 15 linhagens toxigênicas foram avaliadas e classificadas em nove ST diferentes, sendo que dez linhagens foram isoladas dos estados de Pernambuco e Maranhão. Apesar da variabilidade entre os ST estudados no Brasil, os que representaram linhagens dos últimos surtos epidêmicos de difteria (MA 2010 e PE 2015) se mostraram relacionados geneticamente, conforme foi evidenciado no agrupamento dos ST176 e ST643 que diferem apenas em dois nucleotídeos no alelo *leuA* (**Figura 5C, Tabela 5**). O ST176 foi atribuído também a um caso de difteria que ocorreu em Santa Catarina em 2012. Interessante observar que uma linhagem atoxigênica isolada de endocardite em 1999 no Rio de Janeiro também foi classificada como pertencente ao ST176 (VIGUETTI et al., 2013). Também ficou evidente o relacionamento genético entre cepas que circularam em Pernambuco em 2013, onde dois ST deste estado, ST584 e 641, foram agrupados no mesmo clado (clado 4) em um ramo distinto dos ST176 e 643, e foram atribuídos a linhagens toxigênicas, diferindo em apenas um nucleotídeo no alelo *dnak* (**Figura 5C, Tabela 5**). Interessante observar que outras duas linhagens toxigênicas isoladas em Pernambuco em 2013, caracterizadas como pertencentes ao ST212 não apresentaram relação genética com as demais linhagens isoladas em Pernambuco em 2013 (ST584 e ST641), porém foram agrupadas no clado 1 com uma linhagem toxigênica isolada em São Paulo em 2014, diferindo de apenas um nucleotídeo no alelo *odhA* (**Figura 5A, Tabela 5**). No clado 1, em ramos distintos, outras linhagens toxigênicas foram agrupadas, uma linhagem isolada em São Paulo em 2014 e duas linhagens classificadas como ST174 isoladas no Rio de Janeiro em 1981 (VIGUETTI et al., 2012) e no Acre em 2014. Deste modo, o estudo mostrou que ST de linhagens toxigênicas foram disseminados por estados distantes do país, como o ST174 e ST176 e que as linhagens toxigênicas dos dois surtos apresentaram estreita relação filogenética. Por outro lado, a existência de linhagens toxigênicas classificadas em ST não relacionados, aumenta a possibilidade do surgimento de novos surtos no Brasil. Neste estudo não foi possível prever a distribuição correta das linhagens toxigênicas devido a amostragem e a subnotificação de casos.

A presença de linhagens toxigênicas de *C. diphtheriae* que apresentaram ST predominantes e que são encontrados ao longo de vários anos seguidos é comum,

como o caso do ST8, por exemplo, que desde a grande epidemia da Rússia na década de 90, tem sido identificado constantemente em países como Polônia e Bielorrússia (GROSSE-KOCK et al., 2017, CZAJKA et al., 2018). Entre 2016 e 2017, o ST8 também foi encontrado em linhagens da Alemanha (DANGEL et al., 2018). A prevalência de um ST ocorrendo em surtos, também foi relatada em outros estudos como os ocorridos na África do Sul e na Tailândia (DU PLESSIS et al., 2017, PAVEENKITTIPORN et al., 2019). No surto de difteria na África do Sul em 2015, as linhagens toxigênicas predominantes foram atribuídas ao ST378 (DU PLESSIS et al., 2017) e no surto ocorrido na Tailândia em 2012, o principal ST atribuído as linhagens foi o ST243 (PAVEENKITTIPORN et al., 2019).

Uma linhagem isolada de um caso de difteria em São Paulo foi classificada como pertencente ao ST644 (**Figura 4 e 4B**). Na análise filogenética realizada neste estudo, verificamos que a linhagem se agrupa com linhagens da nova espécie *C. belfantii* descrita em 2018 (DAZAS et al., 2018), inclusive a cepa tipo da espécie está depositada no banco do PubMLST. Entretanto, este banco de dados ainda não atualizou as reclassificações que vêm ocorrendo na espécie *C. diphtheriae*. Recentemente, outra espécie toxigênica de *Corynebacterium* foi descrita, o *Corynebacterium rouxii* (BADELL et al., 2020), mas não sabemos o relacionamento desta com *C. diphtheriae* e *C. belfantii* na análise filogenética que realizamos, uma vez que não sabemos se há linhagens no banco de dados do PubMLST desta espécie, pois a cepa tipo e as demais linhagens utilizadas na descrição da espécie nova não estão contempladas no referido banco até o momento. A análise dos cladogramas observados nesse estudo sugerem que as linhagens identificadas como *C. diphtheriae* sejam submetidas a um estudo taxonômico amplo (**Figura 4 e 4B**).

Atualmente *C. diphtheriae* toxigênica é mais frequentemente encontrada em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como o Brasil, Venezuela, Haiti e Colômbia (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019), porém há uma ausência de estudos de MLST nestes locais, o que prejudica a realização de estudos epidemiológicos das linhagens destes países. No final de 2016 a Venezuela informou a Organização Pan-Americana de Saúde e a OMS sobre difteria no país, após muitos anos sem haver relatos. A comunidade Ameríndia, que tem acesso limitado a sistemas de saúde, apresentou dez casos de difteria ocasionados por linhagens toxigênicas, em fevereiro de 2017. Neste período um venezuelano de 4 anos foi para a cidade de

Boa Vista, capital de Roraima, onde veio a óbito pela doença (LODEIRO-COLATOSTI, et al., 2018). Isso realça a importância da necessidade de bons sistemas de vigilância e da realização de estudos epidemiológicos para contenção de casos importados de difteria para o Brasil. Neste estudo, avaliamos o relacionamento filogenético da única linhagem de *C. diphtheriae* depositada no PubMLST isolada da Venezuela em 2017 com as linhagens brasileiras e verificamos que ela foi classificada como ST697 e está estreitamente relacionada com as linhagens pertencentes ao ST174, isolada em 2014 no estado do Acre (**Figura 5A**). Estes dois ST diferem por apenas um nucleotídeo. Este dado fortalece a possibilidade de compartilhamento de linhagens toxigênicas na região Norte do Brasil e países vizinhos que compõem a Amazônia ou a ocorrência de casos importados e até a probabilidade de surtos, caso a cobertura vacinal seja negligenciada naquela região.

As linhagens de *C. diphtheriae* possuem outros fatores de virulência que garantem o sucesso em infecções mesmo nas linhagens que não contêm o gene *tox* (ANTUNES et al., 2018). Estudos mostraram que existem proteínas secretadas por *C. diphtheriae* atoxigênicas que possuem pequenas variações mesmo em linhagens com o mesmo ST, e que estão envolvidas na virulência do micro-organismo. Foi constatada também a presença de pequenas variações entre genes de pili, em linhagens com o mesmo ST. Estas variações podem levar a perda ou ganho de função gênica, podendo contribuir para diferenças na virulência de cada cepa do mesmo ST (SANGAL et al., 2015), o que justifica linhagens com mesmo número de ST associadas a diferentes tipos de doença.

Neste estudo, verificamos linhagens com a mesma sequência tipo que causaram diferentes infecções. O ST176 que foi atribuído a cinco linhagens toxigênicas isoladas no surto de difteria no Maranhão (2010) e em uma linhagem toxigênica que causou difteria em Santa Catarina (2012), foi também caracterizado numa linhagem atoxigênica associada a um quadro invasivo de endocardite ocorrido no Rio de Janeiro em 1999 (VIGUETTI et al., 2012). Este fato ressalta que pode ter ocorrido aquisição do gene *tox* durante o processo evolutivo desta ST. O gene *tox* está presente em corinebacteriófagos, os quais podem lisogenizar *C. diphtheriae*, levando a conversão de uma linhagem atoxigênica para uma toxigênica (SANGAL; HOSKISSON, 2016). No caso do ST67, foi primeiramente isolado como toxigênico em 1980, e em 2015 foi encontrado sem a presença do gene *tox*, o que sugere que

possa ter perdido o gene devido a pressão seletiva da vacina. De acordo com os dados do PubMLST, em outros países as linhagens atribuídas a este ST também apresentaram variação na presença do gene *tox*. O mesmo ocorreu com o ST8 que foi o principal ST da epidemia da Federação Russa nos anos 90, e apareceu na Polônia anos depois como atoxigênico (CZAJKA et al., 2018).

Nos países onde os programas de vacinação são eficazes, e consequentemente garantem mais altas taxas de coberturas vacinais, são cada vez mais frequente casos de infecção por *C. diphtheriae* atoxigênica. Isto se deve ao fato, da espécie poder ter sofrido pressão seletiva da vacina com o toxóide, mudando o perfil geral de toxigenicidade das linhagens de *C. diphtheriae* de toxigênica para atoxigênica. (ZASADA, 2015; BENAMROUCHE et al., 2016; CZAJKA et al., 2018). Na Alemanha 19 casos de linhagens não toxigênicas foram identificados no período de 2016 a 2017 (DANGEL et al., 2018). Czajka et al. relataram que do fim da década de 90 até 2016, houve a circulação apenas de cepas não toxigênicas na Polônia (CZAJKA et al., 2018). Um levantamento dos dados do PubMLST, ratifica o que é apontado nos estudos de MLST feitos na Europa, que demonstraram crescente aumento de cepas não toxigênicas de *C. diphtheriae*. Países como: Alemanha, Reino Unido, França e Bélgica, possuem um elevado número de isolados atoxigênicos depositados na base de dados do PubMLST, de 2010 até o momento atual.

A predominância de *C. diphtheriae* atoxigênica foi observada na amostragem deste estudo. Trinta e duas das 47 (68,01 %) linhagens de *C. diphtheriae* foram atoxigênicas, sendo o maior número proveniente no estado do Rio de Janeiro. Porém não se pode concluir que foi o estado verdadeiramente mais afetado por este patógeno. Este dado pode estar associado a capacidade de profissionais da saúde detectarem infecções, principalmente na cidade do Rio de Janeiro, e devido a colaboração e localização do laboratório LDCIC/UERJ. Pela análise filogenética realizada, assim como as linhagens toxigênicas, as não toxigênicas também apresentaram grande diversidade, contemplando a maioria dos novos ST descritos neste estudo. Alguns ST atoxigênicos deste estudo foram isolados mais de uma vez em pacientes diferentes e causaram variados tipos de doença, como por exemplo, linhagens atribuídas ao ST637 que foram isoladas de caso de endocardite e de úlcera crônica, ratificando que não é possível fazer a relação entre ST e patologia. Interessante observar que alguns perfis de ST continuaram presentes durante o

período avaliado, como exemplo o ST634 que foi atribuído a uma linhagem em 2009 e depois em 2011.

No estudo de Viguetti et al. (2012), quatro linhagens de *C. diphtheriae* atoxigências foram descritas causando endocardite no Rio de Janeiro. Outro caso de endocardite na mesma cidade foi descrito por Encinas et al. (2015) por uma linhagem de *C. diphtheriae* atoxigência isolada em 2013. Neste estudo, mais cinco linhagens atoxigências desta espécie foram descritas causando endocardite no Rio de Janeiro (ST67, ST615, ST171, ST637) e uma em Pernambuco (ST642), que enfatiza o potencial invasivo de linhagens atoxigências de *C. diphtheriae* que não apresentam relacionamento filogenético próximo. Neste contexto, as linhagens atribuídas ao ST171 merecem destaque e estudos posteriores, uma vez que foram atribuídas a casos de endocardite nos anos de 2000, 2013 e 2015.

Por fim, este estudo abordou vários aspectos sobre a epidemiologia molecular das linhagens brasileiras toxigências e atoxigências de *C. diphtheriae* utilizando o esquema de tipagem molecular por MLST. Os resultados obtidos geraram conhecimento sobre a epidemiologia das linhagens toxigências e atoxigências de *C. diphtheriae* que circulam no Brasil, inclusive sobre o relacionamento das linhagens toxigências e dos últimos surtos que ocorreram no Brasil. Além disso, o estudo possibilitou a verificação do relacionamento de uma linhagem que causou difteria na Venezuela com linhagens toxigências brasileiras, preocupação atual devido a surtos no país vizinho e a migração daquela população para o Brasil. Portanto, estes dados podem colaborar com estudos futuros sobre a epidemiologia das linhagens do Brasil, assim como podem ser utilizados para orientar ações de prevenção, como o fortalecimento dos programas de vacinação para garantir coberturas vacinais recomendadas em todos os estados brasileiros e conseqüentemente melhoria no controle da difteria atuando assim, na Vigilância Sanitária.

## 6 CONCLUSÕES

- A análise da sequência do gene *rpoB* não diferenciou as espécies de *C. diphtheriae* e *C. belfantii* conforme recomendado na literatura, porém o esquema de MLST permitiu a confirmação da identificação das linhagens analisadas neste estudo. Apenas uma linhagem toxigênica foi identificada como *C. belfantii*.
- A metodologia de MLST atribuiu 28 sequências tipo (ST) as 47 linhagens avaliadas, sendo 17 ST novos, isto é, que não foram caracterizados em linhagens depositadas no banco de dados do PubMLST.
- Todas as linhagens brasileiras deste estudo foram depositadas no banco de dados PubMLST e poderão ser utilizadas para estudos epidemiológicos futuros.
- Apenas quatro ST atribuídos a linhagens deste estudo também circularam em outros países, de acordo com levantamento realizado no banco de dados PubMLST.
- A amostragem avaliada apresentou um predomínio de linhagens com ausência do gene *tox*, sendo 68,01 % das linhagens atoxigênicas. Estas foram isoladas de diferentes quadros clínicos.
- O estudo das diferenças alélicas realizado pelas análises feitas pela ferramenta *GrapeTree* não foi eficaz para avaliar o relacionamento filogenético entre as linhagens.
- A ferramenta iTOL permitiu a determinação da relação filogenética entre as linhagens deste estudo com as depositadas no banco de dados do PubMLST.
- A variabilidade genética das linhagens brasileiras também foi confirmada na análise filogenética, onde as linhagens de *C. diphtheriae* foram agrupadas em quatro clados. As linhagens caracterizadas neste estudo se distribuíram em três destes quatro clados. De acordo com as análises, tanto linhagens toxigênicas, quanto atoxigênicas, se mostraram dispersas nos clados observados.
- A grande quantidade de ST encontrados pela técnica de MLST confirma a grande variabilidade genética da espécie estudada. Entretanto, os ST que participaram dos surtos de difteria no Brasil foram SLV: ST176/ST643, indicando que evoluíram entre si. Outras linhagens toxigênicas também apresentaram estreito relacionamento, indicando a disseminação da difteria, como as classificadas como ST174, ST176, ST212.

- Linhagens atoxigênicas isoladas de pacientes diferentes e classificadas com o mesmo ST foram relacionados a vários tipos de doença, ratificando que não é possível correlacionar ST com patologia.
- Cinco linhagens anteriormente descritas na cidade do Rio de Janeiro como atoxigênicas e atribuídas a quadros de endocardite, e mais cinco linhagens atoxigênicas do atual estudo, também associadas a endocardite, enfatizam o potencial invasivo de linhagens com ausência do gene *tox* e a presença de outros fatores de virulência além da TD.
- Apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória imediata, existe a subnotificação de casos de difteria. Linhagens toxigênicas avaliadas neste estudo não foram notificadas ao Ministério da Saúde.
- O estudo proporcionou um melhor entendimento sobre a epidemiologia molecular de linhagens brasileiras toxigênicas e atoxigênicas de *C. diphtheriae*, no Brasil.



## REFERÊNCIAS

- ALTO COMISSARIADO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA OS REFUGIADOS. **Chefe da agência da ONU para refugiados pede mais engajamento em áreas do Brasil que abrigam venezuelanos. 2019.** Disponível em: <<https://www.acnur.org/portugues/2019/08/19/alto-comissario-pede-mais-engajamento-venezuelanos/>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- ANTUNES, C.A et al. Complete closed genome sequence of nontoxigenic invasive *Corynebacterium diphtheriae* bv. Mitis strain ISS 3319. **Genome announcements**, v.6, n.5, 2018.
- BADELL, E. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov, a novel member of the diphtheriae species complex. **Research in Microbiology**, 2020.
- BAIO, P. V. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 23-9, 2013.
- BENAMROUCHE, N. et al. Microbiological and molecular characterization of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Algeria between 1992 and 2015. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 12, p. 1005.e1-1005.e7, 2016.
- BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, 2012.
- BILLARD-POMARES, T. et al. Diagnosis in France of a non-toxigenic tox gene-bearing strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a young male back from Senegal. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. ofw271, 2017.
- 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, n. 37, p. 5934-8, 2010.
- BOLT, F. et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4177-85, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Ano 10, nº 2, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Volume Único, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde.** 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Informativa nº 190/2018-bCGDT/DEVIT/SVS/MS.** Brasília, DF, 13 ago. 2018a.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de gerenciamento de risco - Soro antidiftérico, lote 170166**. São Paulo e Brasília, 2018b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Informativa nº 9/2019- CGDT/DEVIT/SVS/MS**. Brasília, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica: Tabela de casos de difteria. 2019b**. Disponível em: <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/difteria>. Acesso em: 13 out. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Ofício circular nº13/2020/SVS/MS**. Brasília, 2020. Acesso em: 18 set. 2020.
- BRODZIK, K.A et al. Analysis of the amino acid sequence variation of the 67-72p protein and the structural pili proteins of *Corynebacterium diphtheriae* for their suitability as potential vaccine antigens. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 233-46, 2019.
- BRONIATOWSKI, D.A. et al. Weaponized health communication: Twitter bots and Russian trolls amplify the vaccine debate. **American Journal of Public Health**, v. 108, n. 10, p. 1378-84, 2018.
- CHANG, C. et al. In vitro reconstitution of sortase-catalyzed pilus polymerization reveals structural elements involved in pilin cross-linking. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 24, p. E5477-E5486, 2018.
- CLINTON, L. K. et al. Culture-negative prosthetic valve endocarditis with concomitant septicemia due to a nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype gravis isolate in a patient with multiple risk factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3900-2, 2013.
- CONASS. Brasília: **Consensus – A queda da imunização no Brasil**, atualizado em: dez. 2017. Disponível em: <http://www.conass.org.br/consensus/queda-da-imunizacao-brasil>. Acesso em: 17 abr. 2020.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Atlanta: Use of Diphtheria Antitoxin (DAT) for Suspected Diphtheria Cases**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/diphtheria/downloads/protocol.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Diphtheria: Diagnosis and Treatment**, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/diphtheria/about/diagnosis-treatment.html>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- CZAJKA, U. et al. Changes in MLST profiles and biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from the diphtheria outbreak period to the period of invasive infections caused by nontoxigenic strains in Poland (1950–2016). **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 121, 2018.

- DANGEL, A. et al. Geographically diverse clusters of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection, Germany, 2016–2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1239, 2018.
- DANGEL, A. et al. NGS-based phylogeny of diphtheria-related pathogenicity factors in different *Corynebacterium* spp. implies species-specific virulence transmission. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 28, 2019.
- DAS VERTENTES, C. **Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE de isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do do Campo das Vertentes, Minas Gerais**. 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.
- DAZAS, Melody et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.68, n.12, p. 3826-3831, 2018.
- DIAS, A. A. S. O. et al. *Corynebacterium ulcerans*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1176-91, 2011.
- DIAS, A. A. S. O. **Avaliação de modelos animais experimentais no desenvolvimento de doenças invasivas por amostras toxinogênicas e atoxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans***. 2011. 143 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.
- DOYLE, Christine J. et al. Sequence analysis of toxin gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* strains, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 105, 2017.
- DU PLESSIS, M. et al. Molecular characterization of *Corynebacterium diphtheriae* outbreak isolates, South Africa, March – June 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1308, 2017.
- ENCINAS, F. et al. Genomic analysis of a nontoxigenic, invasive *Corynebacterium diphtheriae* strain from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 817-19, 2015.
- FORBES, B. A. Did i hear you correctly? The organism identified was *Corynebacterium diphtheriae*? **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 39, n. 5, p. 35-41, 2017.
- GAYRETLI, A. Z. G et al. Screening of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in throat swab specimens of children with upper respiratory tract infections. **Mikrobiyolojibulteni**, v. 51, n. 3, p. 209, 2017.
- GOMES, D. L. R. **Propriedades adesivas e invasivas de amostras de *Corynebacterium diphtheria* e causadoras de infecções atípicas**. 2012. 167 f.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

GROSSE-KOCK, S. et al. Genomic analysis of endemic clones of toxigenic and non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Belarus during and after the major epidemic in 1990s. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 873, 2017.

HASSAN, S. S. et al. The Druggable pocketome of *Corynebacterium diphtheriae*: a new approach for in silico putative druggable targets. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 44, 2018.

JOLLEY, K.A.; MAIDEN M. C. J. **Oxford: Corynebacterium diphtheria MLST databases, 2010**. Disponível em: <<https://pubmlst.org/cdiphtheriae>>. Acesso em: 09 de out. 2018.

LINDHUSEN-LINDHÉ, E.; DOTEVALL, L.; BERGLUND, M. Imported laryngeal and cutaneous diphtheria in tourists returning from western Africa to Sweden, March 2012. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 23, p. 20189, 2012.

LODEIRO-COLATOSTI, A. et al. Diphtheria outbreak in amerindian communities, Wonken, Venezuela, 2016–2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1340, 2018.

LOWE, C. F. et al. Cutaneous diphtheria in the urban poor population of Vancouver, British Columbia, Canada: a 10-year review. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2664-66, 2011.

MAHOMED, S. et al. An isolated outbreak of diphtheria in South Africa, 2015. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 10, p. 2100-08, 2017.

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. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 3, p. 653-66, 2010.

MARTINI, H. et al. Diphtheria in Belgium: 2010–2017. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1517-25, 2019.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R.; DAMASCO, P. V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Revista da Associação Brasileira de Imunologia**, v. 1, p.1-19, 2011.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 11, p.1685-88, 2011.

MATTOS-GUARALDI, AL; HIRATA JR, R; AZEVEDO, VA. *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* – General Aspects. In: BURKOVISK, A. ***Corynebacterium diphtheriae* and related**

**toxigenic species - Genomics, Pathogenicity and Applications.** California: Springer Science & Business Media, 2013. 310 p.

MAY, M. L. A; MCDUGALL, R. J.; ROBSON, J. M. *Corynebacterium diphtheriae* and the returned tropical traveler. **Journal of Travel Medicine**, v. 21, n. 1, p. 39-44, 2013.

MCMULLEN, A. R. et al. When good bugs go bad: epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant, opportunistic pathogen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e01111-17, 2017.

MÉDICOS SEM FRONTEIRA. **Da Cólera à difteria, 2017.** Disponível em: <<https://www.msf.org.br/noticias/da-colera-difteria>>. Acesso em: 13 fev. 2019

MÉDICOS SEM FRONTEIRA. **Golpeados por uma doença de outro século, 2018.** Disponível em: <<https://www.msf.org.br/noticias/golpeados-por-uma-doenca-de-outro-seculo>>. Acesso em: 13 fev. 2019.

MEINEL, D. M. et al. Outbreak investigation for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* wound infections in refugees from Northeast Africa and Syria in Switzerland and Germany by whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 12, p. 1003.e1-1003.e8, 2016.

MOORE, L. S. P et al. *Corynebacterium ulcerans* cutaneous diphtheria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1100-07, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Epidemiological update diphtheria.** Washington, 2019a. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=diphtheria-8968&alias=47537-22-january-2019-diphtheria-epidemiological-update&Itemid=270&lang=pt](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=diphtheria-8968&alias=47537-22-january-2019-diphtheria-epidemiological-update&Itemid=270&lang=pt)>. Acesso em: 08 ago. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **MEDTROP 2019: OPAS apresenta cenário da difteria na região das Américas.** Brasília, 2019b. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5995:medtrop-2019-opas-apresenta-cenario-da-difteria-na-regiao-das-americas&Itemid=820](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5995:medtrop-2019-opas-apresenta-cenario-da-difteria-na-regiao-das-americas&Itemid=820)>. Acesso em: 11 dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Vinte milhões de crianças perderam vacinas contra sarampo, difteria e tétano em 2018.** Brasília, 2019c. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5986:vinte-milhoes-de-criancas-perderam-vacinas-contra-sarampo-difteria-e-tetano-em-2018&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5986:vinte-milhoes-de-criancas-perderam-vacinas-contra-sarampo-difteria-e-tetano-em-2018&Itemid=812)> Acesso em: 11 dez. 2019.

OTT, L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 2, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological update: diphtheria**. 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/MARIAH~1/AppData/Local/Temp/2019-jan-22-phe-epi-update-diphtheria.pdf>. Acesso em: 10 maio 2020.

PARTE, A.C. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1825-29, 2018. Disponível em: <https://www.bacterio.net/>. Acesso em: 19 set. 2020.

PAVEENKITTIPORN, W. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of outbreak-associated *Corynebacterium diphtheriae* in Thailand, 2012. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, p. 104007, 2019.

PEIXOTO, R. S. et al. Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 1311-21, 2016.

PUBMLST [Internet]. Coventry (UK): **Corynebacterium diphtheriae/ulcerans isolates database, 2010**. Disponível em: [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_cdiphtheriae\\_isolates](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_cdiphtheriae_isolates). Acesso em: 10 maio de 2020.

RAMOS, J. N. **Caracterização de estirpes sugestivas de corinebactérias isoladas de sítios intravenosos**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

REYNOLDS, G. E. et al. Public health action following an outbreak of toxigenic cutaneous diphtheria in an Auckland refugee resettlement centre. **Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report**, v. 40, n. 4, p. E475-81, 2016.

SAID, R. **Doenças imunopreveníveis-Saúde Brasil: como os brasileiros nascem, adoecem e morrem**. In: 16a EXPO EPI, 2019, Brasília, Brasil. Anais eletrônicos.... Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/10/Apresenta---o-Expoepi-Sa--de-Brasil-Rodrigo-Said.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2020.

SAIKYA, L. et al. Diphtheria outbreak in Assam, India. **The Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, p. 647-52, 2010.

SANGAL, V. et al. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 765, 2015.

SANGAL, V.; HOSKISSON, P. A. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: new perspectives on an old foe. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 364-70, 2016.

- SANGAL, L. et al. Resurgence of diphtheria in north Kerala, India, 2016: laboratory supported case - based surveillance outcomes. **Frontiers in Public Health**, v. 5, p. 218, 2017.
- SANTOS, L. S. et al. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 4, p. 791-8, 2015.
- SCHUMANN, P.; PUKALL, R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 369-75, 2013.
- SEKAR, R. S. K. et al. Strengthening the laboratory diagnosis of pathogenic *Corynebacterium* species in the vaccine era. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 354-365, 2017.
- SELIM, S. A. et al. Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 282-7, 2016.
- SETH-SMITH, H.; EGLI, A. Whole genome sequencing for surveillance of diphtheria in low incidence settings. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 235, 2019.
- SHARMA, N. C. et al. Diphtheria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 82, p.1-18, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41572-019-0139-3>>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- SKOGMAR, S.; THAM, J. Severe diphtheria with neurologic and myocardial involvement in a Swedish patient: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 359, 2018.
- SMITH, H. L. et al. Potency of a human monoclonal antibody to diphtheria toxin relative to equine diphtheria anti-toxin in a guinea pig intoxication model. **Virulence**, v. 7, n. 6, p. 660-8, 2016.
- SOUZA, C. et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 242-248, 2015.
- TORRES, L. F. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 272-9, 2013.
- TROST, E. et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3199-215, 2012.

- VIANA, M. V. C. et al. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0176347, 2017.
- VIGUETTI, S. C. Z. **Epidemiologia molecular de linhagens invasivas de *Corynebacterium diphtheria* utilizando o método MLST**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.
- VIGUETTI, S. Z. et al. **Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil**. *Epidemiology & Infection*, v. 140, n. 4, p. 617-20, 2012.
- WEERASEKERA, D. et al. The C-terminal coiled-coil domain of *Corynebacterium diphtheriae* DIP0733 is crucial for interaction with epithelial cells and pathogenicity in invertebrate animal model systems. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 106, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization, Vaccines and Biologicals - WHO-recommended surveillance standard of diphtheria**. 2014. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/passive/diphtheria\\_standards/en](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/diphtheria_standards/en). Acesso em: 8 abr. 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258681/WER9231.pdf;jsessionid=35506EDD2FF8430DDF69413A3AA07EA9?sequence=1>. Acesso em: 5 nov. 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diphtheria tetanus toxoid and pertussis (DTP3) immunization coverage among 1-year-olds**. 2019. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/immunization/dtp3/atlas.html](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/immunization/dtp3/atlas.html). Acesso em: 18 abr. 2020.
- ZAKIKHANY, K.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003-2012. **Eurosurveillance**, v. 5, n. 19, p. 22, 2014.
- ZASADA, A. A. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. **Przegl Epidemiology**, v. 69, n. 3, p. 439-44, 2015.